

**DINEIN KÖNNYŰ LÁNC – EGY EUKARIÓTA
CSOMÓPONTI FEHÉRJE KÖLCSÖNHATÁSAINAK
TERMODINAMIKAI, KINETIKAI ÉS SZERKEZETI
VIZSGÁLATA**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Radnai László

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológia Doktori

Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Gráf László



Témavezető: Dr. Nyitrai László

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

Budapest, 2012

1. Összefoglalás

Az LC8 dinein könnyű lánc (DYNLL) egy rendkívül konzervált eukarióta csomóponti („hub”) fehérje, melynek több mint negyven kötőpartnere és számos funkciója ismert. Szerepet játszik többek között az apoptózisban, vírusfertőzések kialakulásában, a dinein és a miozin Va motorfehérje komplexek részeként az intracelluláris transzportfolyamatokban. Homodimer szerkezetét a monomerek közötti intermolekuláris β -redő kölcsönhatások stabilizálják. A DYNLL a partnerek rendezetlen régióiban található, 8 aminosav hosszúságú lineáris kötőmotívumokkal lép kölcsönhatásba, melyek meglehetősen nagy diverzitást mutatnak. Kutatócsoportunk azonosította korábban a miozin Va DYNLL kötő motívumát (DBD), mely szekvenciájában jelentősen eltér más ismert motívumoktól. Jelen munkában a komplex szerkezetét röntgen-kristallográfiával megoldva igazoltuk, hogy a miozin Va más partnerekhez hasonlóan kötődik a DYNLL-hez, azonban a kötődésben meglepő módon a szigorúan vett kötő motívumtól C- és N-terminális irányban található néhány aminosav is részt vesz. Emlősökben a DYNLL-nek két izoformája ismert: DYNLL1 és DYNLL2. Ezek különböző partnerekhez történő kötődésének kinetikai és termodinamikai paramétereit összehasonlítva megmutattuk, hogy a két izoforma *in vitro* rendkívül hasonlóan viselkedik, tehát az *in vivo* megfigyelhető különbségek hátterében külső tényezők állnak. Négy különböző partner DYNLL2-höz történő kötődését vizsgálva a szekvenciák jelentős különbségei ellenére meglepően hasonló kötési erősségeket mértünk (disszociációs állandó: 1-40 μ M). A komplexképződés további termodinamikai és kinetikai paraméterei is hasonlóak voltak, kivéve érdekes módon a legtipikusabb kötőmotívumot (Bmf), melynél pl. a komplex disszociációja nagyságrendekkel lassabb volt. Mivel a kötőpartnerek többsége *in vivo* dimer, vizsgáltuk bivalens ligandumok kötődését is. Ezek a megfelelő monomerekhez viszonyítva két-három nagyságrenddel erősebb kötődést mutattak, aminek az oka – kinetikai, ill. röntgen-kristallográfiái bizonyítékok szerint – az aviditás. Kinetikai méréseink felfedték a partnerek kötődési mechanizmusának részleteit is, melyet az ún. konformációs szelekció modell segítségével lehet a legjobban leírni. Fág bemutatással (Phage display) végrehajtott mesterséges evolúció során kutatócsoportunk talált egy szokatlanul erősen (nM-os disszociációs állandó) a DYNLL-hez kötődni képes fehérjét (EML3). Az erős kötődés okait röntgen-kristallográfiával sikerült felderítenünk. Végül a DYNLL foszforilációs módosításának hatásait (Ser88) is vizsgáltuk a komplex kialakulására: a foszforiláció a kötőpeptid látszólagos affinitását két nagyságrenddel csökkentette.

2. Summary

LC8 dynein light chain (DYNLL) is a highly conserved eukaryotic hub protein with more than 40 experimentally verified binding partners and various functions. Beyond being a subunit of dynein and myosin Va motor protein complexes and thus playing a role in intracellular transport, it is involved in apoptosis, viral infection, and several other biological processes. DYNLL forms homodimers by a beta-chain swapping mechanism. Binding partners interact with DYNLL by an eight residue long linear peptide motifs localized in disordered protein segments. The sequences of these motifs are highly diverse. We have previously identified the DYNLL binding domain (DBD) of myosin Va, which shows significant differences compared to the majority of known motifs („non-canonical” motif). Here we present the crystal structure of DBD in complex with DYNLL and show that this sequence binds very similarly to DYNLL as other partners. Interestingly, a few residues flanking the strictly defined binding motif also participate in binding. DYNLL has two mammalian isoforms: DYNLL1 and DYNLL2. We compared the kinetic and thermodynamic parameters of binding of both isoforms to different partner motifs and report very similar behaviour *in vitro*, indicating that the formerly described *in vivo* differences must be caused by extrinsic factors. By comparing binding properties of four different DYNLL partners to DYNLL2, we observed remarkably similar affinities (K_d : 1-40 μ M) in spite of the high number of differences between amino acid sequences in the motifs. In general, other thermodynamic and kinetic parameters were also similar, except for the most typical binding motif of Bmf, where the dissociation of the complex was several orders of magnitude slower. As most DYNLL partners are homodimeric *in vivo*, we also measured the binding of bivalent ligands to DYNLL2. They showed approximately three orders of magnitude higher affinity compared to the corresponding monovalent ligands. Based on our kinetic and X-ray crystallographic evidences, we conclude that the affinity enhancement is caused by avidity. Transient kinetic measurements also revealed that the peptide ligand binding reactions occur mainly according to the so-called conformational selection model. By using a directed evolution approach (phage display), we identified a new DYNLL binding partner (EML3), which showed strikingly low (nanomolar) dissociation constant. This unusually high affinity can be explained by our X-ray crystallographic studies presented here. We also investigated the effect of the phosphorylation of DYNLL (Ser88) on the complex formation, and found that the apparent affinity of the binding motif was decreased by two orders of magnitude.

3. Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás.....	2
2. Summary	3
3. Tartalomjegyzék.....	4
4. Bevezető	6
4.1. Egy csomóponti fehérje, a dinein könnyűlánc (DYNLL)	6
4.2. A DYNLL szerkezete	7
4.3. A DYNLL sejtekben betöltött általános szerepe és a DYNLL izoformák	9
4.4. A partnerek lineáris kötőmotívumok segítségével lépnek interakcióba a DYNLL-lel	10
4.5. A DYNLL szabályozása.....	11
4.6. A DYNLL vizsgált kötőpartnerei.....	12
4.6.1. Bmf (<i>Bcl-2 modifying factor</i>).....	12
4.6.2. Miozin Va – egy nem kanonikus kötőpartner	13
4.6.3. nNOS (<i>neuronal nitric oxide synthase</i>).....	16
4.6.4. Pak1 (<i>p21-activated kinase</i>).....	17
4.6.5. EML3 (<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 3</i>)	18
4.7. EML3 - egy új, nagy affinitású DYNLL kötőpartner azonosítása <i>in vitro</i> evolúciós megközelítéssel	18
5. Célkitűzések	21
6. Anyagok és módszerek.....	24
6.1. DNS konstrukciók készítése.....	24
6.2. Fehérje expresszió és tisztítás	26
6.3. Peptidek szintézise és tisztítása.....	26
6.4. Izotermális titráló kalorimetria (ITC).....	27
6.5. Felszíni plazmon rezonancia (SPR)	28
6.6. Fluoreszcencia anizotrópia	28
6.7. Megállított áramlásos fluoreszcens spektroszkópia (<i>Stopped-flow</i>).....	29
6.8. Fehérje krisztallográfia és röntgendiffrakció	30
7. Eredmények.....	33
7.1. A DYNLL1 és DYNLL2 izoformák termodinamikai és kinetikai összehasonlítása	33
7.2. A különböző kötőmotívumok összehasonlítása	34
7.3. A partnerek dimer állapota a látszólagos affinitást nagyságrendekkel növeli.....	36
7.4. A DYNLL foszforilációjának modellezése – az S88E mutáns kötődése monomer és dimer partnerekhez.....	37

7.5.	A komplexképződés részletes kinetikai analízise - kétlépéses reakciómechanizmus	39
7.6.	Az eddig leírt legnagyobb affinitású kötőmotívum DYNLL2-vel alkotott komplexének atomi felbontású szerkezete	42
7.7.	A miozin Va - DYNLL2 interakció szerkezeti alapjai	46
8.	Diszkusszió	49
8.1.	A DYNLL izoformák különböző partnerekhez történő kötődése hasonló paraméterekkel jellemezhető.	49
8.2.	A kötődés erősségének finomhangolása a partner szekvenciák változatosságán keresztül valósul meg	50
8.3.	Az aviditás fontossága: több százszor erősebb kötődés a DYNLL és partnerei között....	51
8.4.	A DYNLL szabályozásának egy lehetséges módja: dimerek foszforilációt követő disszociációja	53
8.5.	A fehérjepartnerek kötődése a DYNLL-hez két lépésben történik	54
8.6.	Aviditás, komplex stabilitás és funkció a DYNLL interakciós hálózatában.....	56
8.7.	Az EML3 szokatlanul erős DYNLL kötődésének szerkezeti vonatkozásai és az aviditás ..	57
8.8.	Kargó-adapter hipotézis új megvilágításban	58
9.	Köszönetnyilvánítás	66
10.	Publikációs lista.....	67
10.1.	A doktori dolgozat témájában megjelent közlemények	67
10.2.	Egyéb közlemények	69
11.	Hivatkozások jegyzéke.....	70
12.	Függelék.....	80
12.1.	Bizonyítás: két kötőhelyes rendszer leírása egy kötőhelyet feltételező modell segítségével	80
12.2.	Röntgen-kristallográfiai mérések, illetve a modellépítés és finomítás statisztikai adatai	84
12.3.	Bizonyítás: az indukált illeszkedés (IF), a konformációs szelekció (CS), valamint az egyszerű kötődési egyensúly modellek összehasonlítása	85
12.4.	A DYNLL-partner interakciók kinetikai analízise	88
12.5.	A Konformációs Szelekció (CS) és az Indukált Illeszkedés (IF) modellek segítségével meghatározott kinetikai állandók	90
12.6.	A DYNLL izoformák <i>in vitro</i> foszforilációja Pak1 kináz által.....	92
12.7.	A FitSpace Explorer algoritmus működése a DYNLL2-nNOS interakció példáján szemléltetve.....	93

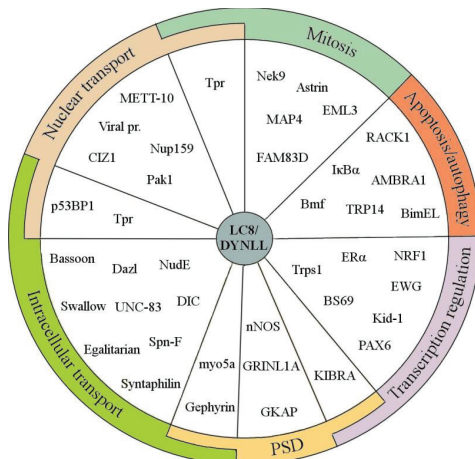
4. Bevezető

4.1. Egy csomóponti fehérje, a dinein könnyűlánc (DYNLL)

Az élő sejtek működésében kulcsfontosságú szerep jut a fehérjéknek, melyek funkciójukat legtöbbször csak egy vagy több más fehérjével, illetve a sejt egyéb komponenseivel történő specifikus kölcsönhatások kialakításán keresztül képesek megvalósítani. Az életjelenségek, megértéséhez elengedhetetlenül fontos ezen elemi interakciók megismerése, valamint a teljes kölcsönhatási hálózat, az interaktom feltérképezése (1, 2). Az ilyen, fehérje-fehérje interakciós (PPI) hálózatok jellemzője, hogy legtöbb elemük kevés számú partnerrel rendelkezik. Néhány elem viszont fontos, központi szerepet tölt be az által, hogy kölcsönhatásainak száma igen nagy. Ezeket csomóponti, vagy „hub” fehérjéknek nevezzük (1). Az ilyen fehérjék esetleges deléciója jelentős fenotípusos változásokat, gyakran letalitást okoz (3), ami arra vezethető vissza, hogy a kialakított interakciók számának növekedésével az élőlény szempontjából esszenciális kölcsönhatásokban való részvétel valószínűsége is nagyobb (4). Számtalan jól ismert csomóponti fehérjével találkozhatunk a szakirodalomban (pl.: p53, p21, ubikvitin), melyek többsége különböző betegségekben játszik szerepet, így potenciális gyógyszermolekulacélpontokként tekinthetünk a hub fehérjékre (1).

A doktori munkám során vizsgált LC8 dinein könnyűlánc (DYNLL (5); további, az irodalomban elterjedt elnevezései: DLC; PIN) egy konzervált, eukarióta csomóponti fehérje (6). Eredetileg a dinein (7), majd később a miozin Va (myoVa) motorfehérje-komplexek alegységeként írták le (8), azonban az újabban felfedezett, kísérletesen igazolt kötőpartnereinek a száma egyre nő (9). Ezek a fehérjék az intracelluláris transzporton kívül a sejtek működésének legkülönbözőbb folyamataiban vesznek részt (1. Ábra). Példaként említhető a proapoptotikus Bmf (*Bcl-2 modifying factor*) (10) és Bim (*Bcl-2 interacting mediator*) (11), a neuronokban a nitrogén-monoxid szintéziséért felelős nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*) (12), az ERα (az egyik ösztrogén receptor izoforma) (13), a citoskeletális jelátvitelben szereplő protein-kináz, a Pak1 (*p21 activated protein kinase 1*) (14, 15), a *Swallow* nevű *Drosophila* fehérje, mely a *bicoid* mRNS oocitákon belüli lokalizációjáért felelős (16), a Nup159 nevű élesztő fehérje, mely a sejtmagi transzport folyamatokban játszik szerepet (17), illetve számos vírusfehérje (18, 19). Maga a DYNLL létfontosságú szerepet tölt be a sejtekben; teljes funkcióvesztéses mutációja *Drosophila melanogaster* esetén letális, embrionális korban bekövetkező apoptotikus sejtpusztuláshoz

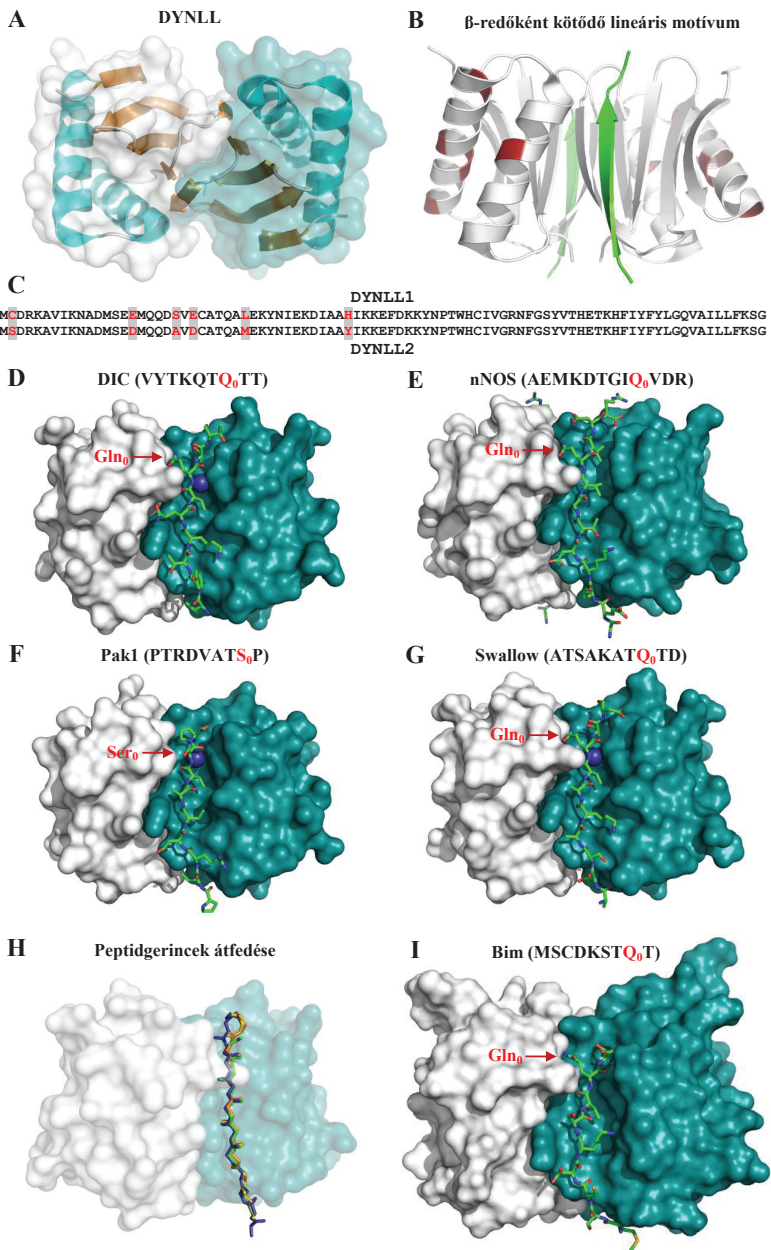
vezet (20). Saját, Vellai Tibor csoportjával kollaborációban végzett vizsgálataink szerint *C. elegans*-ban a gén csendesítése szintén embrionálisan letális, illetve túlélés esetén pleiotróp fenotípushoz vezet (Vellai, Rapali, Nyitray, nem közölt eredmények).



1. ábra: A DYNLL néhány kísérletesen igazolt kötőpartnere, valamint ezek sejtben betöltött szerepe (9).

4.2. A DYNLL szerkezete

A DYNLL atomi felbontású szerkezetét több esetben sikerült NMR spektroszkópiával (1F3C (21); 1RE6 (22)), illetve röntgendiffrakcióval (1YO3 (23); 3DVT (24); 3BRI (25)) meghatározni (2/A. ábra). Számos olyan szerkezetet is ismerünk, ahol a DYNLL komplexet alkot a különböző partnereiből származó, rövid kötőpeptidekkel (2/D.-2/I. ábra). (NMR: 1F95, 1F96, (21); röntgendiffrakció: 1CMI (26); 3DVP (24); 3E2B, 2P2T (27); 2PG1 (28); 3F3M, 3GLW (29)). A DYNLL szimmetrikus homodimereket alkot. A dimerek magját két β -lemez alkotja, melyek öt-öt antiparallel szálból épülnek fel úgy, hogy négy szál az egyik, míg az ötödik a másik alegységből származik. A β -lemezek mellett két-két külső α -hélixet látunk. A dimerek két oldalán, éppen az alegységek találkozásánál egy-egy árokszerű bemélyedés húzódik végig (2/A. ábra). Ezekbe az árokba illeszkednek be a partner fehérjék lineáris kötőmotívumai, egy hatodik, antiparallel β -szállal kiegészítve a DYNLL magját alkotó két β -lemezt (2/B. ábra).



2. ábra: A DYNLL röntgen-kristallográfiával meghatározott szerkezete (pdb: 3DVT). A fehérje szimmetrikus homodimer, alegységeit minden ábrán fehér és zöldeskék színek jelölik. A szerkezeti mag két, öt-öt antiparallel láncból felépülő β -redőből (narancs) áll, melyekben az egyik láncot a szemközti monomer adja. Ezt a magot határolja két pár α -hélix (világoskék). A monomerek interakciós felszínének mentén (fent és lent) két hosszban elnyúló, hidrofób árok jön létre. (A) A DYNLL kötőpartnerei (eredetileg szerkezet nélküli) lineáris motívumaikkal β -redőként kötődnek a hidrofób kötőárkokba (pdb: 3E2B), ezáltal egy hatodik, antiparallel láncsal (zöld) egészítik ki a szerkezeti mag β -lemezeit. A DYNLL α -hélicein pirossal jelölt pozíciók a humán paralógok (DYNLL1 és DYNLL2) közötti eltéréseket mutatják. Látható, hogy ezek távol esnek a kötőárkoktól. (B) A humán paralógok szekvenciáinak illesztése. A két polipeptidlánc mindössze hat aminosavban különbözik. (C) A DYNLL1 dinein intermedier láncsal (DIC) (pdb: 2P2T) (D), nNOS-sal (pdb: 1CMI) (E) Pak1-gyel (pdb: 3DVP) (F) és Swallow-val (pdb: 3E2B) (G) alkotott komplexei és a kötőmotívumok szekvenciái, pirossal jelölve a „0. pozíciót”, melyet a kanonikus kötőpartnerekben minden esetben glutamin foglal el. (A nagy többség ilyen, kivétel pl. az itt bemutatott Pak1.) Dolgozatomban a jobb érthetőség kedvéért a kötőmotívum szekvenciák pozícióira ettől az oldallánctól N-terminális irányban alsó indexbe írt negatív, míg C-terminális irányban pozitív egész számokkal hivatkozom. (Pl. a DIC kötőmotívuma: $V_6Y_5T_4K_3Q_2T_1Q_0T_1T_2$). Érdekes, hogy a peptidek kötődésében általában részt vesznek szerkezeti vízmolekulák is, melyek egyidejűleg képesek hidrogénkötést kialakítani a peptiddel és a fehérjével, ezáltal stabilizálva a komplexet. A legtipikusabb ilyen vízmolekulát, mely egy kivételével (nNOS) minden szerkezetben látható, és a 0. pozícióban található aminosav alatt helyezkedik el, sötétkék színnel ábrázoltam. (D)(E)(F)(G) A D, E, F és G ábrákon látható, röntgen-kristallográfiával meghatározott szerkezetek illesztése: bár a kötőpeptid-szekvenciák jelentősen eltérnek, a peptidgerincek (kék: nNOS, zöld: Pak1, narancs: DIC, sárga: Swallow) mégis meglepően hasonló pozíciót és konformációt vesznek fel a kötőárkokban. (Az egyes komplexekben a DYNLL felszíne a kötőárók „alkalmazkodásának” köszönhetően némileg eltérő. Erre a dolgot későbbi fejezeteiben térek ki; itt pusztán a könnyebb tájékozódás kedvéért a G-ábrán is látható felszínt ábrázoltam.) (H) A DYNLL1 Bim-mel (pdb: 1F95) alkotott komplexe és a kötőmotívum szekvenciája, pirossal jelölve a 0. pozíciót. Ezt a szerkezetet az eddigiektől eltérően NMR spektroszkópiával határozták meg. Talán éppen ez, vagyis az eltérő mérési körülmények és módszer lehet a magyarázat arra, hogy a peptid konformációja és árkon belüli pozíciója némileg eltér az eddig bemutatottaktól. (I)

4.3. A DYNLL sejtekben betöltött általános szerepe és a DYNLL izoformák

Ma már nyilvánvaló, hogy a DYNLL egy olyan csomóponti fehérje, mely kulcsfontosságú szerepet tölt be az eukarióta sejtek életének számos meghatározó eseményében, mint például az apoptózis, a különböző transzportfolyamatok, vírusfertőzés, a rák kialakulása, vagy a transzkripció szabályozása (6, 30). Korábban feltételezték, hogy képes lehet dinein és miozin Va motorfehérje komplexekben kargó-adapter funkció betöltésére (10, 11, 31-35). Ez a szállítandó fehérje és a motor egyidejű kötését igényelné, közvetlen fizikai kapcsolatot teremtve a kettő között. A kargó-adapter hipotézis azonban

nehezen összeegyeztethető a DYNLL, illetve legtöbb partnerének szimmetrikus homodimer szerkezetével, beleértve a miozin Va-t (36) illetve a dinein intermedier láncot (DIC), melyhez a dinein-komplexben kötődik (37, 38). Ehelyett ma már inkább elfogadott az az alternatív hipotézis, mi szerint a DYNLL a partner fehérjék dimerizációjának elősegítésén, illetve a dimer partnerek szerkezetének stabilizálásán keresztül szabályozza azok működését (6, 39, 40).

A DYNLL-nek 2 izoformáját írták le emlőssőkben: DYNLL1 és DYNLL2 (korábbi elnevezéseik: DLC1 és DLC2, vagy LC8a és LC8b) (5, 31, 41). Ezek mindössze 6 oldalláncban különböznek, melyek valamennyien a kötőárktól távol helyezkednek el (2/B. és 2/C. ábra). Annak ellenére, hogy a két izoforma között igen nagy a hasonlóság, sejten belül képesek lehetnek specifikusan kötni bizonyos partnereket (10, 22). *In vitro* kísérletekben viszont ugyanezt még nem sikerült megfigyelni (31, 42).

A DYNLL izoformák sejten belül betöltött szabályozó szerepe az egyes partnerekkel kialakított kölcsönhatásokon keresztül valósul meg. A 4.6. fejezetben több konkrét kölcsönhatás illetve DYNLL funkció is bemutatásra kerül.

4.4. A partnerek lineáris kötőmotívumok segítségével lépnek interakcióba a DYNLL-lel

A DYNLL kötőárai olyan rövid, lineáris peptid motívumokkal képesek interakcióba lépni, melyek eredetileg a partner fehérje egy szerkezet nélküli régiójának részei (6, 30). A kötődés hatására ezek a szakaszok szerkezetet nyernek, ahogy az a 2/B. ábrán is látható, β -redővé rendeződve csatlakoznak a DYNLL kötőárkához, kiterjesztve a DYNLL magját képező β -lemezt. Meglepő módon a DYNLL-hez kötődő partner szekvenciák között az esetek egy részében igen kevés hasonlóság fedezhető fel, ezért korábban három szekvencia-osztályt alakítottak ki: $K_3X_2T_1Q_0T_1X_2$ -típusú szekvenciák (pl.: DIC, Swallow, Bim, Bmf), $X_3G_2I/V_1Q_0V_1D_2$ -típusú szekvenciák (pl.: nNOS) és az úgynevezett nem-kanonikus szekvenciák, melyek egyik előző osztályba sem sorolhatóak, sőt egymástól is jelentősen eltérnek (pl.: myoVa és Pak1) (21, 24, 39, 43, 44). Arról viszont nincs információ, hogy a szekvenciákban látható különbségek okoznak-e bármilyen funkcionális különbséget.

Különböző partnerekből származó kötőpeptidek, illetve nagyobb fragmentumok DYNLL-hez való affinitása ismert, de meglepő módon a meghatározott disszociációs állandók (K_d) értékei elég széles tartományban, 100 nM és 100 μ M között szóródnak (24,

39, 45-49). Okozhatják-e a szekvenciák között megfigyelhető eltérések, vagy a különböző mérőmódszerek ezeket a különbségeket? A kérdés megválaszolásához érdemes figyelembe vennünk azt a tényt is, hogy a kötőpartnerek jelentős része bizonyítottan dimer, illetve sokakban találunk dimerizációért felelős (pl. *coiled-coil*) szekvenciákat, így a legtöbb esetben a DYNLL dimer:dimer komplexeket alkot partnereivel (39, 40). Éppen ezért a monomer kötőpeptidekkel meghatározott disszociációs állandók nem feltétlenül alkalmasak a dimer, vagyis bivalens partnerekkel történő interakciók jellemzésére. (28) Egy korábbi munka során mi is megfigyeltük, hogy egy dimer miozin Va fragmentum nagyobb erősséggel kötődött a DYNLL-hez, mint a kötőszekvenciának megfelelő, monomer peptid (39). Hasonló eredményt azóta egy dimer dinein intermedier lánc (DIC) fragmentum esetén is leírtak (28).

4.5. A DYNLL szabályozása

Habár a DYNLL szabályozásának több módját is leírták már, számos nyitott kérdésre nem született még válasz. Ismert, hogy egyes partnerek kötőmotívumaiban található treonin vagy szerin oldalláncok foszforilációja gátolja a DYNLL-hez történő kötődést (50). Hasonlóképpen a DYNLL foszforilációja gátolja a partnerek kötődését az által, hogy a DYNLL monomer-dimer egyensúlyát (mely fiziológias körülmények között erősen a dimer képződés irányába van eltolva) a monomer képződés irányába tolja el, ami a kötőárkok megszűnéséhez vezet (46, 49). Sajnos nem teljesen nyilvánvaló, hogy melyik protein-kináz szerepel ebben a folyamatban. Korábban a Pak1-ről – mely egyben kötőpartnere is a DYNLL izoformáknak (14, 15) – mutatták ki, hogy foszforilálja a DYNLL-t (14, 51). Újabb tanulmányok viszont a kináznak ezt a szerepét kétségbe vonják (24). Kimutatták a DYNLL1 redoxpotenciál általi regulációját is. (52) A DYNLL1 esetén a génexpresszió szintjének szabályozása is ismert: az ASCIZ nevű transzkripciósfaktor (más néven ATMIN) közvetlenül kötődik a DYNLL1 promóteréhez, ezáltal a DYNLL1 expressziója megnövekszik (53). Azonban az ASCIZ egyben kötőpartnere is a DYNLL1-nek, így DYNLL1 „szenzorként” is működik. Ha a DYNLL1 az ASCIZ molekulához kötődik, gátolja saját expresszióját (53).

4.6. A DYNLL vizsgált kötőpartnerei

Doktori munkám során öt partnerfehérje – a miozin Va, az nNOS, a Bmf, a Pak1, és az EML3 – DYNLL-hez történő kötődését vizsgáltam, termodinamikai, kinetikai és szerkezeti módszerekkel. Ebben a fejezetben ezek rövid bemutatására törekszem, külön kitérve a DYNLL izoformákkal való kapcsolatukra.

4.6.1. Bmf (*Bcl-2 modifying factor*)

A Bmf a Bcl-2 családba tartozó proapoptotikus fehérje, mely a család többi tagjával pusztán a rövid BH3-domén meglétében mutat hasonlóságot (10). Egészséges sejtekben a miozin V-tel és – izoforma specifikus módon – a DYNLL2-vel asszociálódva a sejtvázasz aktin filamentumaihoz szervesztrálódik. A BH3 domén szükséges ahhoz, hogy bizonyos apoptotikus stimulusok hatására (pl. a sejt extracelluláris mátrixszal való kapcsolatának elvesztése) a sejtvásról felszabadulva áthelyeződjön a mitokondrium külső membránjára, majd ott anti-apoptotikus (Bcl-2) fehérjékkel kölcsönhatásba lépve apoptózist indukáljon (10, 54). Érdekes, hogy egy hasonló pro-apoptotikus fehérje, a Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) *in vivo* szelektíven kötődik a DYNLL1 izoformához, miáltal a dinein motorfehérje komplexen keresztül a mikrotubulusokhoz szervesztrálódik (10, 11). Fontos megjegyeznünk, hogy többek között ezek a megfigyelések szolgáltatnak alapot a DYNLL kargó-adapter szerepének feltételezéséhez. A DYNLL izoformák specifikus kötődése a Bim és Bmf fehérjékhez *in vitro* nem tapasztalható, azonban *in vivo* egyetlen oldalláncnyi különbségre vezethető vissza a jelenség (Tyr41 a DYNLL1 és His41 a DYNLL2 esetén) (22).

Melanóma sejtvonalakon végzett kísérletek arra utalnak, hogy a Bmf és a Bim együttes felszabadulása szükséges a sejtváas megfelelő elemeiről az apoptózis beindításához (55). Ez (az esetek egy részében) a MEK kináz gátlásával elérhető, vagyis a két fehérje működésének szabályozásában a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvas fontos szerepet játszik (55). Újabb eredmények szerint a melanóma sejtekben a MEK által aktivált ERK2 kináz közvetlenül foszforilálja a Bmf-et a DYNLL-kötő motívumon belül, ám ez meglepő módon nem befolyásolja a DYNLL2-höz történő kötődést, viszont a Bmf funkciójának gátlásához vezet (56). A Bmf és a Bim együttműködésére utal továbbá, hogy környezeti stressz, például az UV sugárzás, a JNK nevű protein-kináz aktiválódását okozza, melynek szubsztrátja mindkét fehérje (50). A DYNLL kötőmotívumon belül történő, JNK általi foszforiláció gátolja a Bim DYNLL1

izomformához való kötődését, ezáltal a sejtvázról felszabadulhat, ami az apoptotikus aktivitásának megnövekedéséhez vezet (50). A Bmf esetén a szerzők hasonló mechanizmust feltételeznek (50), ám ez igen nehezen összeegyeztethető az ERK2 kináz esetén tapasztaltakkal (56). További ellentmondás, hogy a JNK általi foszforilációs szabályzásnak a Bmf esetén fontos szerepét mutatták ki a spermatogenezisben (57), illetve a *Neisseria gonorrhoeae* baktérium által okozott apoptotikus sejtpusztulás során is (58). Utóbbi újabb példa a Bim és Bmf együttműködésére (58). A sejtek alacsony energiaszintje, mint stressz szignál, az AMP-aktivált protein kináz (AMPK) aktiválódásához vezet, ami a Bmf transzkripció erősítésén, majd a megnövekedett Bmf szinten keresztül apoptózist okoz (59).

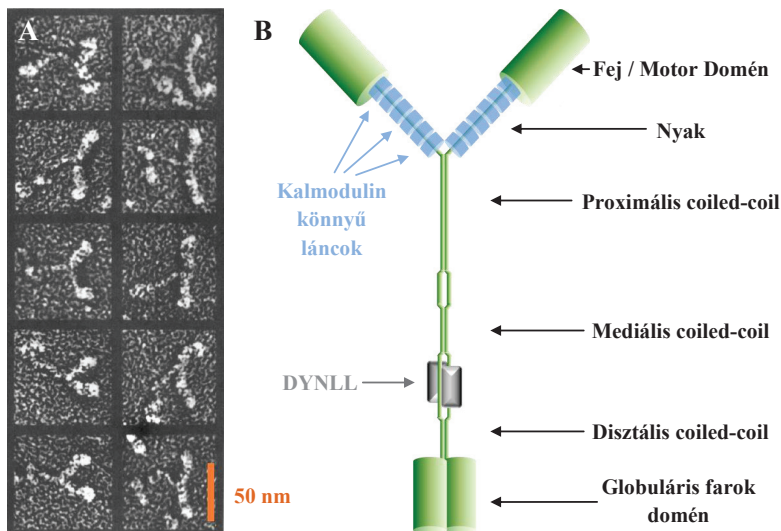
A Bmf-nek szerepe van továbbá az egyedfejlődés során (60), tumor szuppressorként (61-65), valamint a B-limfociták fejlődésében (61, 65). Bmf hiányában a B-limfociták rezisztensekké válnak bizonyos apoptotikus stimulusokra (61). Érdekes módon UV sugárzás, vagy az extracelluláris mátrixszal való kapcsolat megszakadása bizonyos sejttípusokban a Bmf jelenléte nélkül is képes apoptózist indukálni (61), míg például az emlőmirigyek fejlődése során egyértelmű, hogy a Bmf (és a Bim) kulcsfontosságú az extracelluláris mátrixszal nem kapcsolódó sejtek pusztulásában (66-68). Mindez a Bmf sejt, illetve szövet specifikus szerepére, továbbá redundáns, kiegészítő funkciókra utal, ami általános a pro-apoptotikus fehérjék körében (69). Mellrák sejteken végzett újabb kutatások szerint a Bmf és a Bim versengenek a Bcl-2 és a Bcl-xl fehérjék kötéséért: paclitaxel nevű hatóanyaggal apoptózist indukálva megfigyelték, hogy a Bmf lecseréli a Bim-et ezekben a komplexekben, mely így a Bax és Bak fehérjéket aktiválva közvetítheti az apoptotikus szignált (70).

4.6.2. Miozin Va – egy nem kanonikus kötőpartner

A miozin Va-t Larson és munkatársai 1988-ban írták le először, 190 kDa-os kalmodulin-kötő fehérjeként, mely az agyi aktomiozin-rendszerhez asszociálódik (71). Később megfigyelték, hogy kalcium-függő módon foszforilálódik, valamint, hogy Ca^{2+} - és kalmodulin-függő MgATPáz aktivitást mutat (72). Azt, hogy a vizsgált 190 kDa-os fehérje valóban egy miozin, négy évvel később, biokémiai és immunológiai módszerekkel sikerült igazolni (73). A fehérje szekvenciájának meghatározása után nyilvánvalóvá vált, hogy egy korábban még le nem írt nem-konvencionális miozin család képviselőjéről van szó, melyet miozin V-nek neveztek el (74). A molekulán belül fej, nyak, farok és globuláris farok

doméneket lehet elkülöníteni (74, 75). A doménszerkezet elektronmikroszkópos felvételeken jól kivehető (3/A. ábra) (36). A fej, vagy motor-domén felelős az aktin- és ATP-kötésért, valamint az erőgenerálásért. A nyak 6 kalmódulin-kötő IQ-motívumot tartalmaz, így 24 nm-es hossza kiemelkedőnek nevezhető a miozin szupercsalád tagjai között. A farok doménen belül három dimerizációért felelős *coiled-coil* szekvenciát (proximális, mediális és disztális *coiled-coil*) különböztetünk meg. A globuláris farok domén legfontosabb funkciója a kargó-kötés (3/B. ábra) (75).

A miozin Va motor funkcióját Mehta és munkatársai vizsgálták először 1999-ben (76). A miozin Va processzív motor, mely az aktin filamentumok mentén nagy, ~36 nm-es lépéseket tesz (76, 77). Ezek a szokatlanul nagy lépések az erőkarnak, vagyis a különösen hosszú, hat könnyűláncot (általában kalmódulin) kötő nyaki régiónak köszönhetőek (78-81). A processzív mozgást egyedi molekula kísérletekben *in vitro* (82-84), illetve *in vivo* rendszerben (85-88) többen is megfigyelték. A mozgás gyaloglás-szerű, úgynevezett *hand-over-hand* mechanizmussal történik, amit számos bizonyíték támaszt alá (89-93).



3. ábra: (A) A dimer miozin V molekulák elektronmikroszkópos képe (36). Jól kivehető az ábrákon a miozin V két feje (jobbra), a hosszú nyaki régiók, a dimerizációért felelős *coiled-coil* szekvenciákat tartalmazó farok domén, valamint a globuláris farok domén. (36). (B) A miozin Va sematikus ábrázolása.

A humán miozin Va farokrégiója alternatív splicing által érintett (94). A különböző exon mintázattal rendelkező változatok expressziója adott sejttípusra jellemző: Az „A”,

„C” és „E” exonok minden változatban megjelennek, míg a „B”, „D” és „F” exonok alternatív módon fejeződnek ki (94). A sejt típusra jellemző alternatív exon mintázat meghatározza a szállítandó kargót az által, hogy bizonyos kargó-adapter fehérjék specifikusan kötődnek ezekhez a szekvenciákhoz: a D-exonhoz a Rab10 (95), míg az F-exonhoz a melanofilin (96).

A DYNLL kötődését a miozin Va-hoz először 2000-ben figyelték meg (8). Saját korábbi munkánk során sikerült meghatározni, a DYNLL miozin Va-n belüli kötőrégióját (Ile1280-Ile1294) (39). Ez a szakasz a farokdomén mediális és disztális *coiled-coil* régiói között helyezkedik el (3/B. ábra). Az interakció létrejöttéhez szükségesnek bizonyult a pusztán 3 aminosavas B-exon (DDK) megléte a kötőrégióon belül. Érdekes módon a miozin Va estén egy nem kanonikus DYNLL kötőmotívumot fedeztünk fel (IQPKDDKNT₁M₀T₁DST), melyben a tipikusnak nevezhető, központi „T₁Q₀T₁”, vagy „I₁Q₀V₁” szekvencia-részletek helyett „T₁M₀T₁” szekvenciát találtunk. A DYNLL kötődése stabilizálta a környező *coiled-coil* régiókat (39). Eredményeinket egy tőlünk független kutatócsoport is megerősítette (47).

A miozin Va aktin filamentumok mentén történő, rövidtávú vezikula-transzportban betöltött szerteágazó szerepe ma is intenzíven kutatott kérdéskör. A legtöbb információ a molekula idegsejtekben és melanocitákban betöltött funkcióiról áll a rendelkezésünkre (97, 98).

Idegsejtekben szerepet játszik az axonok fejlődésében (99), az endoplazmatikus retikulum dendrittűskékbe történő transzportjában (100), továbbá a szinaptikus vezikulumok szállításában is (101-105). Ezen kívül részt vesz a GluR1 glutamát receptor, dendrittűskék membránjába történő transzlokációjában (106), a PTEN nevű lipid-foszfátáz (mely egy olyan szignalizációs hálózat eleme, amelynek az agyi idegsejtek méretének meghatározásában van szerepe) sejtmembránba történő eljuttatásában (107), a RILPL2 fehérje szállításán keresztül, az idegsejtek dendrittűskéinek kialakításában és fenntartásában (108).

Melanocitákban a miozin Va a melanoszóma-khoz kötődik, melyek a szőrzet színéért felelős pigmentet tartalmazó, specializált organellek (109, 110). A molekula funkcionális hibája esetén a melanoszóma-k nem halmozódnak fel a melanociták dendritjeiben (111). Az ilyen sejtekben a melanoszóma-k a mikrotubulusok mentén eljutnak ugyan a dendritekbe, ám vissza is transzportálódnak a sejtmag irányába, vagyis a miozin Va a periférián „átveszi” a melanoszóma-t a mikrotubuluson közlekedő motoroktól (112). Érdekes módon maguknak a dendriteknek a kialakulásában is szerepet játszik (113). A

melanoszóma és a motor között két fehérje teremti meg a kapcsolatot: a melanoszóma membránjához kötődő Rab27a és az ehhez, valamint a miozin Va-hoz egyidejűleg kötődő melanofilin (96, 114-126).

4.6.3. nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*)

A nitrogén-monoxid (NO) egy jól ismert jelátvivő molekula, melynek számos idegrendszeri, immunrendszeri valamint a szív- és érrendszeri szerepe van (127). A fiziológias funkciók mellett sejtkárosító hatása is ismert, ugyanis, amennyiben nagy mennyiségben szintetizálódik, toxikus reaktív nitrogén intermedierek (RNS) képződhetnek belőle (128), ahogyan azt megfigyelhetjük számos súlyos betegség esetén, mint például az infarktus, a rák vagy a neurodegeneratív betegségek (129). Szintéziséért a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) felelős, melyeknek három izoformáját különböztetjük meg: neuronális (nNOS), endoteliális (eNOS) és indukálható (iNOS) változatokat (130). Mindhárom enzim közös jellemzője, hogy a nitrogén-monoxidot az arginin oxidációjával állítják elő (130). Az nNOS és eNOS működését az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció kalcmodulin-közvetített módon szabályozza, míg az iNOS aktivitása Ca^{2+} koncentrációtól független (128).

Az nNOS legfőképp az idegsejtekben, ott is a szinapszisokban fordul elő, de sima-, szív- és vázizomban is megtalálható (127). Szerepe van többek között a szinaptikus és az intracelluláris jelátvitelben (131), a neurogenesisben (132), a memória kialakulásában és az erek tónusának szabályozásában (133), de olyan betegségekben is, mint a depresszió, a Parkinson- vagy az Alzheimer-kór (133). Monomer formában inaktív, működéséhez dimerizáció szükséges, aminek feltétele két kofaktor, a tetrahidrobiopterin és a hem, valamint az L-arginin kötődése is (132, 134). Az nNOS sejten belüli lokalizációját különböző adapter fehérjékkel történő interakciói határozzák meg (127, 132). Ilyenek például idegsejtekben a poszt-szinaptikus denzitásban megtalálható PSD-93 és PSD-95 fehérjék, melyek az NMDA 2B receptorhoz kötődnek (135, 136), vagy a preszinapszisban található CAPON fehérje, mely a szinapszin I-hez, II-höz és III-hoz is kötődik (137). Érdekes, hogy a PSD-95 nem csak közvetlenül kapcsolódik az nNOS-hoz, hanem a GKAP nevű állványfehérjén keresztül is, mely viszont specifikus kötőpartnere a DYNLL2 izoformának *in vivo* (31, 138). Az nNOS esetén eddig csak a DYNLL1 izoformával való közvetlen interakciót írták le (12). A DYNLL1-et éppen ezért PIN-nek (*Protein Inhibitor of nNOS*, „az nNOS fehérje inhibitora”) is nevezik (12), bár az inhibitor szerep vitatott

(127, 139). Tudjuk azt is, hogy simaizmokban a miozin Va – mely maga is DYNLL kötőpartner – felelős az nNOS fehérje idegvégződésekre történő transzportjáért (140). Mindez jól egybevág a DYNLL izoformák feltételezett kargó-adapter szerepével, ám továbbra is fennáll a lehetősége annak, hogy az említett fehérjék közvetlenül, esetleg más adapter-fehérjék segítségével kapcsolódnak a miozin és dinein komplexekhez.

4.6.4. Pak1 (*p21-activated kinase*)

A Pak1 a p21-aktivált szerin/treonin kinázok I-es csoportjába tartozik, melyet a II-es csoporttól egy autoinhibitor-domén meglete különít el (141). Többféle extracelluláris szignál hatását közvetítve, a Cdc42 és a Rac1 kis GTP-ázok effektoraként befolyásolja az aktin citoskeleton organizációját, a sejt alakját, mozgását, a sejtosztódást és a túlélést. A Pak1 megnövekedett expressziós szintjét figyelték meg húgyhólyag-, petefészek-, és mellrák esetén (141). Mellrákos sejtekben a sejtmagban lokalizálódó Pak1 az ER α (ösztrogén receptor- α , szintén DYNLL-kötőpartner (13)) közvetlen foszforilációján keresztül, ligandum független módon aktiválja azt (142, 143). Foszforilálja továbbá az Ebp1 nevű transzkripciós faktort, mely normálisan korepresszorként gátolja a proliferációért felelős gének kifejeződését, ám foszforilált állapotban erre nem képes (144). A Pak1 szabályozatlan aktivitása elősegíti a rákos sejtek letapadás-független növekedését (145), továbbá önmagában elég a mellrák kialakulásához, ahogy azt transzgen egerekkel végzett kutatások bizonyítják (146).

A DYNLL izoformák kötődése a Pak1 kinázhoz (14, 15) – jelenlegi tudásunk szerint – nem vezet azok foszforilációjához (24), viszont szükséges a kináz sejtmagba történő transzportjához (147). Ez elengedhetetlen a normális egyedfejlődés során például a zebrahal, de feltehetően más gerincesek esetén is. A DYNLL kötődése valószínűleg a Pak1 konformációs változásán keresztül egy közeli nukleáris lokalizációs szignált (NLS) tesz hozzáférhetővé, ami elősegíti a Pak1 importin-közvetített sejtmagba jutását. (147).

A DYNLL2 Pak1-hez történő kötődését elősegíti a Pak1 foszforilációja a CDK11(p58) kináz által, mely a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet (148). A foszforilált Pak1-DYNLL2 komplex szállításában valószínűleg a miozin Va vesz részt. A Pak1 feltehetőleg a CDK11(p58) effektoraként funkcionál a mitózis során (148).

4.6.5. EML3 (*Echinoderm microtubule-associated protein-like 3*)

Az EML3 fehérjéről (vagy EMAP-3, Uniprot: Q32P44) igen kevés szakirodalmi ismeret áll rendelkezésünkre. A mitózis során a mitotikus orsó mikrotubulusaihoz kötődik és szerepe van a metafázisban a kromoszómák megfelelő pozicionálásában (149). Interfázisban a citoplazmatikus mikrotubulusokhoz kötődik, valamint a sejtmagban halmozódik fel (149). A mikrotubulus-kötő képesség, mely a konzervált HELP doménnek köszönhető (149-151), általánosan jellemző az EMAP család más tagjaira is (150, 152, 153); Nevükkel ellentétben nem csak tüskésbőrűekben találjuk meg őket; többek között emberi sejtekben is fontos szerepük van (149-151, 153, 154), például a humán EML4 a mikrotubulus hálózat megfelelő kialakulásában (150), illetve a mikrotubulusok stabilizálásában (154) játszik szerepet, míg az EML2 destabilizálja a mikrotubulusokat (151).

Az EML3 fehérjét a DYNLL kötőpartnereként kutatócsoportunk írta le a közelmúltban (155). Ennek a munkának az előzményeit, részleteit és eredményeit a következő fejezetben (4.7.) foglalom össze. Ezt indokolja, hogy saját részvételem a kísérletsorozatban pusztán a röntgen-kristallográfiai munkákra korlátozódott. Dolgozatom további fejezeteiben kizárólag az EML3 kötőmotívumának DYNLL2-vel alkotott kristályszerkezetét, az ebből levonható következtetéseket fogom bemutatni, melyek megértéséhez azonban nélkülözhetetlen a háttérismerek áttekintése.

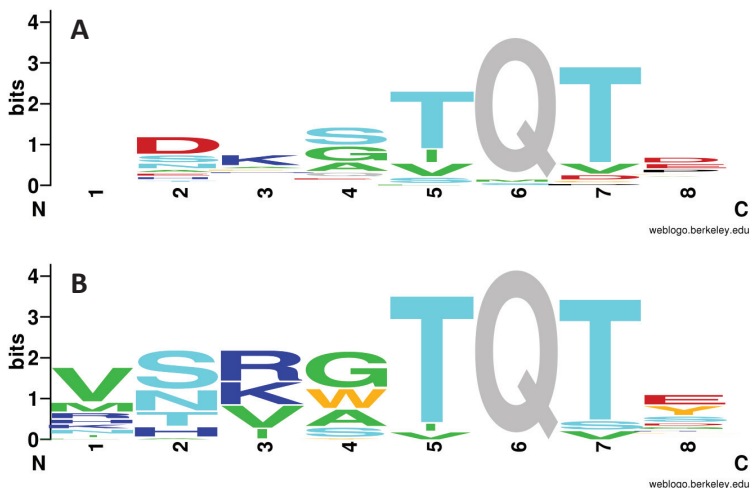
4.7. EML3 - egy új, nagy affinitású DYNLL kötőpartner azonosítása *in vitro* evolúciós megközelítéssel

Munkánk kezdetén összegyűjtöttük az összes korábban azonosított, kanonikus DYNLL-kötőmotívum szekvenciát (összesen 41 darabot, 33 eukarióta fehérjéből), melyek között mindkét szekvenciaosztály képviselőit megtaláljuk. Ezek alapján a következő, hét tagú konszenzus képe rajzolódott ki: [D/S]₄K₃X₂[T/V/I]₁Q₀[T/V]₁[D/E]₂.

Célunk volt annak felderítése, hogy az egyes pozíciók milyen aminosav preferenciával jellemezhetőek, tehát, hogy mely oldallancok jelenléte előnyös az adott helyen a DYNLL-hez történő kötődés szempontjából. Ehhez *in vitro* evolúciós megközelítést, azaz fágbemutató (phage display) technikát alkalmaztunk. M13 fág felszínén bemutatott peptidkönyvtárat hoztunk létre, melyben a konzervált glutamin környezetében lévő hét pozíciót (-5, -4, -3, -2, -1, 1, 2) teljesen randomizáltuk. A fág felszínén a peptidek bivalens formában, leucin-cipzárral dimerizálva kerültek bemutatásra

azért, hogy a természetes állapothoz hasonló módon, dimer:dimer komplexek képződhessenek. A kísérletsorozat végeztével a következő konszenzus kötőmotívum-szekvenciát sikerült meghatározni: V₃S₄R₃G₂T₁Q₀T₁E₂. Az egyes pozíciókra jellemző aminosav preferenciákat mind a mesterséges, mind a természetes úton evolválódott szekvenciák esetén a *WebLogo* program (156) segítségével, szekvencia „logo” formájában ábrázoltuk (4. ábra).

A természetes és a mesterséges szekvenciák „logo”-i sok hasonlóságot mutatnak. Példaként a -1-es és +1-es pozíciókban megfigyelhető magas konzerváltságot és a treonin preferált megjelenését, vagy a +2-es pozícióban a negatív, míg a -3-as pozícióban pozitív töltésű aminosavak iránti preferenciát említhetjük meg. Az első, szembetűnő különbséget a -4-es pozícióban láthatjuk, ahol az *in vitro* evolúció nem mutatott negatív töltésű oldalláncra irányuló preferenciát, míg a természetben ugyanitt az aszpartát a leggyakoribb aminosav. A másik fontos különbség, hogy amíg a természetes szekvenciák esetén a -5-ös pozícióban nem látunk aminosav preferenciát, addig a mesterséges evolúció során itt leginkább apoláros, vagy hosszú alifás szénláncsal rendelkező poláros oldalláncok jelentek meg. A leggyakoribb aminosav ebben a pozícióban a valin volt.



4. ábra: A természetes (A) és a mesterséges evolúcióval létrehozott (B) DYNLL kötőmotívumok „logo” ábrázolása (155). Az egyes pozíciókban a betűk összesített magassága a konzerváltságot tükrözi, míg az egyes betűk magassága az aminosavak normalizált arányát jelképezi. A hasonló kémiai tulajdonságokkal jellemezhető aminosavakat azonos színnel jelöltük. Az ábra a *WebLogo* programmal készült (156).

A természetes és a mesterséges konszenzus szekvenciák (DKSTQTD és VSRGTQTE) kötődését a DYNLL-hez szintetikus, N-terminálison acetilált peptidok segítségével, izotermális titráló kalorimetriával (ITC) vizsgáltuk. Hogy a Val₅ kötődésben betöltött szerepét felderítsük, több kontroll peptidet is készítettünk. A Val₅ helyére glicint beépítve az oldallánc hozzájárulását, míg az egész aminosavat acetil-csoporttal helyettesítve a peptidgerinc amid-csoportjának hozzájárulását tudtuk felmérni. A természetes konszenzus szekvencia hasonlóan módosított változatait is elkészítettük (Val₅, Gly₅, illetve acetilált) Mindkét konszenzus peptid esetén a pusztán acetilált változat disszociációs állandója a μM -os tartományba esett. A glicin megjelenése a -5-ös pozícióban mindkét esetben tízszeres affinitás-növekedéshez vezetett. A valin ugyanitt még jobban stabilizálta a komplexeket. (Az Ac-VSRGTQTE peptid a valaha mért legerősebb DYNLL kötést mutatta; a disszociációs állandó 80 nM volt, szemben az általában jellemző néhány mikromólos értékkel!) A mért entalpiaváltozások arra utaltak, hogy a peptidgerinc amid csoportja és a valin oldallánca is stabilizáló interakciókat alakít ki a DYNLL fehérjével.

Saját hozzájárulásom ehhez a munkához az itt leírtak szerkezeti okainak felderítése volt. További, a dolgozatom szempontjából fontos eredmény, hogy az említett konszenzus peptidok leucin-cipzárral dimerizált változatainak DYNLL-hez kötődését összehasonlítva a monomer peptidekkel a látszólagos affinitás nagyságrendekkel való növekedését tapasztaltuk (szubnanomólos disszociációs állandó). Ezt magyarázhatja a bivalencia következtében fellépő aviditás, mely hipotézist sikerült atomi felbontású szerkezettel alátámasztanunk. Az avidításra később több fejezetben is kitérek.

Az *in vitro* evolúcióval meghatározott kötőmotívum szekvenciákat, illetve ezek információtartalmát felhasználva, bioinformatikai módszerekkel sikerült számos, korábban le nem írt DYNLL kötőpartnert jósolnunk. A keresést a humán, intracelluláris fehérjék rendezetlen régióira korlátoztuk, hogy az irreleváns találatokat kiszűrjük. Megtaláltuk magát a mesterséges konszenzus szekvenciát is (VSRGTQTE) az EML3 nevű fehérjében, melyről korábban nem volt ismert, hogy képes kötődni a DYNLL-hez. Később *in vitro*, ITC mérésekkel igazoltuk, hogy egy nagyobb, rekombináns EML3 fragmentum (8–94. aminosav), melyben a VSRGTQTE motívum közelében egy *coiled-coil* domén is megtalálható, erősen kötődik a DYNLL-hez ($K_d \sim 50 \text{ nM}$).

5. Célkitűzések

Ahhoz, hogy feltérképezhessük a sejtek fehérje-interakciós hálózatát (az interaktomot), megérthessük annak működését, mindenekelőtt az egyedi fehérje-fehérje kölcsönhatások kvalitatív és kvantitatív leírására van szükség. Munkánk kezdetén a DYNLL-nek számos kötőpartnerét azonosították már. Sok esetben a kötésért felelős lineáris motívum szekvenciája is ismert volt. A DYNLL, mint csomóponti fehérje elsőre talán meglepő tulajdonsága, hogy az igen nagy diverzitást mutató kötőmotívum-szekvenciákhoz alapvetően ugyanazzal a felszínnel képes kötődni (kötőárok). Némely esetben az interakció erősségére vonatkozó kvantitatív adatok is rendelkezésünkre álltak, melyek azonban sokszor az egymással történő közvetlen összehasonlításra alkalmatlanok voltak. Vajon milyen összefüggés van a motívum szekvenciája és a kötés erőssége között? Jelent-e az eltérő szekvencia bármilyen funkcionális különbséget? Hogyan valósulhat meg, hogy egy fehérje ilyen sok különböző motívum specifikus kötésére képes ugyanazzal a felszínnel?

A DYNLL két izoformájára (DYNLL1 és DYNLL2) vonatkozóan a szakirodalom egyes esetekben szelektív partnerekötésről, míg máskor ennek hiányáról számolt be. Okozhat-e bármilyen jelentős termodinamikai vagy kinetikai különbséget a két izoforma viselkedésében a mindössze hat aminosavnyi eltérés? A különböző kötőmotívum szekvenciák talán éppen a két izoforma szelektív kötődését teszik lehetővé?

A DYNLL homodimereket alkot. Partnerei többségéről szintén tudjuk, hogy dimer, vagy tartalmaz dimerizációért felelős szekvenciákat, pl. *coiled-coil*t. Valószínű tehát, hogy a DYNLL sok esetben dimer-dimer komplexeket képez partnereivel, ahogyan ezt néhány esetben kísérletes bizonyítékok is alátámasztják. Felmerül a kérdés, hogy vajon a dimerizáció hogyan befolyásolja az egyes partnerek kötődését?

A DYNLL 88. szerin oldalláncán történő foszforilációja a monomer-dimer egyensúly eltolását, a dimer állapot destabilizálódását, ezáltal a kötőárok elvesztését okozza. A foszforiláció vajon minden esetben – függetlenül a partner monomer vagy dimer állapotától – a partnerekötés megszűnéséhez vezet? Mennyire lehet hatékony ez a szabályozási forma a DYNLL esetén?

Ismerünk olyan nem-kanonikus kötőmotívum szekvenciákat is, mint pl. a miozin Va. Hogyan tudnak ezek a szekvenciák a DYNLL-hez kötődni? Vajon ezek is a

kötőárokba illeszkednek? Esetleg a DYNLL más felszínével alakítanak ki interakciót? Mi lehet a szerepe a B-exonnak a miozin Va - DYNLL komplex esetén?

Egy párhuzamos munkában, a DYNLL kötőmotívumokat *in vitro* evolúciós módszerrel karakterizáltuk. A kapott eredményeket felhasználva *in silico* számos új DYNLL partnert prediktáltunk, közöttük az EML3 fehérjét, mely a valaha leírt legnagyobb affinitást mutatta. Milyen szerkezeti okok állhatnak ennek hátterében? Hogyan lehet képes ez a motívum több nagyságrenddel erősebb kötődésre, mint az eddig megismert partnerek?

Feltett kérdések megválaszolásához az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

- A DYNLL izoformák partnerkötésének közvetlen, kvantitatív összehasonlítása termodinamikai és kinetikai adatok alapján a KXTQTX és XGI/VQVD családok egy-egy tipikus képviselőjét felhasználva. A két fehérje (Bmf és nNOS) kiválasztásánál a fő szempont az volt, hogy mindkettő esetén csak az egyik DYNLL izoformával való interakciót figyelték meg korábban *in vivo* (Bmf-DYNLL2, nNOS-DYNLL1). A termodinamikai paramétereket ITC-vel, míg a kinetikai konstansokat megállított áramlásos fluoreszcens spektroszkópiával (*stopped-flow*) határoztuk meg.
- A miozin Va-DYNLL interakció szerkezeti vizsgálata röntgen-krisztallográfia módszerrel.
- A különböző motívumok kötődésének közvetlen, kvantitatív összehasonlítása termodinamikai és kinetikai szempontok alapján. Ehhez a már említett két kanonikus partner (Bmf és nNOS) mellé két nem-kanonikus partnert is választottunk (myoVa, Pak1). Módszerek: ITC, *stopped-flow*.
- A partner dimerizáció következtében fellépő bivalencia kötődésre gyakorolt hatásának termodinamikai, kinetikai és szerkezeti vizsgálata. Módszerek: ITC, *stopped-flow*, felszíni plazmon rezonancia (SPR), röntgen-krisztallográfia. Ehhez modellrendszerként a miozin Va-t választottuk, hiszen a kötőmotívum dimerizációja itt a körülötte elhelyezkedő *coiled-coil* régióknak köszönhető. Ezek viszonylag egyszerű szerkezete, stabilitása, könnyű renaturálhatósága a kísérleteket nagyban megkönnyítette. Készítettünk továbbá hasonló, leucin-cipzárral dimerizált mesterséges modell-rendszereket is, a Bmf, illetve az EML3 kötőmotívumát felhasználva. Előbbire a termodinamikai és kinetikai, utóbbira a röntgen-krisztallográfiai kísérleteknél volt szükség.

- Annak felderítése, hogy a DYNLL 88. szerin oldalláncán történő foszforiláció milyen módon befolyásolja a partnerek kötődésének termodinamikáját és kinetikáját. Mivel a foszforilációt végző kináz nem ismert, a 88. szerin oldalláncot glutamátra cseréltük, hogy modellezzük a foszforiláció hatását. Monomer partnerként a Bmf-et, míg dimer partnerként a miozin Va-t választottuk. Előbbi esetben az interakciókat fluoreszcencia anizotrópia, míg utóbbi esetben felszíni plazmon rezonancia módszerrel vizsgáltuk.
- Az EML3-DYNLL interakció szerkezeti vizsgálata röntgen-kristallográfia módszerrel.

6. Anyagok és módszerek

6.1. DNS konstrukciók készítése

A humán **DYNLL2**-t kódoló DNS szakaszt (Q96FJ2, 1.-89. aminosav) agyi cDNS-ből (*RevertAid First cDNA synthesis kit*, Fermentas) PCR-rel amplifikáltuk, a terméket NdeI és EcoRI restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd pET15b vektorba klónoztuk.

A **DYNLL2 S88E mutáns** készítése során a fehérjét kódoló DNS szakasz amplifikálását PCR-rel végeztük, a vad típusú fehérjét kódoló konstrukciót templátként használva. A mutációt, mivel az a fehérje utolsó előtti aminosav oldalláncát érinti, a megfelelő primer segítségével vittük be.

A **monomer miozin Va fragmentum**nak (Q9Y4II-2, 1275.-1297. aminosav) megfelelő DNS szakaszt humán hasnyálmirigy cDNS könyvtárát (Stratagene) templátként használva PCR-rel amplifikáltuk, a terméket BamHI és EcoRI restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd pGEX4T-1 vektorba klónoztuk.

A **dimer miozin Va fragmentum** esetén a miozin Va farok régiójának egy részét (1209.-1320. aminosav, mely két *coiled-coil* szekvencia között egy szerkezet nélküli szakaszt tartalmaz, benne a DYNLL kötő régióval) PCR-rel amplifikáltuk, majd a megaprimer-módszer (157) használatával a PCR-termék 5' és 3' végére is egy-egy leucin-cipzárt kódoló szekvenciát fuzionáltunk. A leucin-cipzár egy GCN4 (P03069) nevű élesztő transzkripció faktorból származott (250.-278. aminosav az N-terminálásra, 255.-281. aminosav a C-terminálásra). Erre azért volt szükség, hogy a dimerek stabilitását megnöveljük. Az így elkészült PCR terméket NdeI és BglII restrikciós endonukleázokkal emésztettük, majd pET15b vektorba klónoztuk, úgy, hogy a vektort NdeI és BamHI enzimekkel hasítottuk, kihasználva a BglII és BamHI enzimek által létrehozott ragadó végék komplementaritását.

A **teljes DYNLL1**-nek (P63167, 1.-89. aminosav), illetve a **Bmf** (Q96LC9, 1.-159. aminosav), és **Pak1** (Q13153, 203.-268. aminosav) **fragmentumok**nak megfelelő DNS szakaszokat PCR-rel amplifikáltuk, majd pET15b (Novagen) vektorba klónoztuk az NdeI and EcoRI restrikciós enzimek használatával. A templátként használt konstrukciókat Dr. I. Rodríguez-Crespo-tól (DYNLL1), Dr. M. G. Hinds-től (Bmf), és Dr. R. Kumar-tól (Pak1) kaptuk.

A **dimer Bmf fragmentum** készítésekor egy hosszú, szintetikus oligonukleotid tartalmazta a Bmf DYNLL kötőmotívumának megfelelő DNS szakaszt (64.-73. aminosav), melyet egy négy aminosavas linker (GGSG) szekvenciát kódoló rész követett, végül egy a fentebb említett leucin-cipzár 5' végével komplementer szakasz. Ezt primerként használva PCR-rel amplifikáltuk a leucin-cipzárnak megfelelő DNS-t (GCN4, 250.-281. aminosav), majd a létrejött fúziós terméket pET15b vektorba klónoztuk NdeI és BglII/BamHI restrikciós enzimek használatával, a dimer miozin Va fragmentum készítésénél leírtak szerint.

Fehérje	Uniprot	Szakasz	Vektor	Restrikciós enzimek
dinein könnyű lánc 1 (DYNLL1)	P63167	1-89	pET15b	NdeI, EcoRI
dinein könnyű lánc 2 (DYNLL2)	Q96FJ2	1-89	pET15b	NdeI, EcoRI
dinein könnyű lánc 2 S88E (DYNLL2 S88E)	Q96FJ2	1-89	pET15b	NdeI, EcoRI
monomer miozin Va	Q9Y4I1	1275-1297	pGEX4T-1	BamHI, EcoRI
dimer miozin Va*	Q9Y4I1	1209-1320	pET15b	NdeI, BamHI/BglII
Bmf (Bcl-2-modifying factor)	Q96LC9	1-159	pET15b	NdeI, EcoRI
dimer Bmf (Bcl-2-modifying factor)**	Q96LC9	64-73	pET15b	NdeI, BamHI/BglII
Pak1 (p21-activated kinase 1)	Q13153	203-268	pET15b	NdeI, EcoRI
dimer EML3***	Q32P44	81-88	módosított pET	BamHI, BglII

I. Táblázat: A munkánk során felhasznált DNS konstrukciók adatai. *A miozin Va kódoló szekvenciájának a táblázatban megadott darabját PCR-rel amplifikáltuk, majd egy leucin-cipzárat kódoló szekvenciát illesztettünk a termék két végére (GCN4 250.-278. aminosav az N-terminálisra; GCN4 255.-281. aminosav a C-terminálisra) megaprimer-módszer használatával. **A dimer Bmf fragmentumot kódoló DNS előállítása egy szintetikus oligonukleotid segítségével történt, mely tartalmazta a Bmf táblázatban jelölt szakaszát, valamint ettől C-terminális irányban egy négy aminosavas linkert kódoló szekvenciát (GGSG). Ezt az oligonukleotidot használtuk 5' primerként egy PCR reakcióban, ahol a GCN4 250.-281. aminosavának megfelelő szakaszt amplifikáltuk. A PCR terméket pET15b vektorba illesztettük NdeI és BglII/BamHI (kompatibilis túlnyúló végek) enzimek használatával. ***A dimer EML3 fragmentum készítése során először a GCN4 (250.-281. aminosav) leucin-cipzárt kódoló DNS szakaszt BamHI és BglII restrikciós enzimekkel egy módosított pET expressziós vektorba illesztettük, majd második lépésként az EML3 kötőmotívumnak, illetve a 4 aminosavas linker (GGSG) szekvenciának megfelelő szintetikus DNS darabot az így elkészült konstrukcióba ültettük be.

A **dimer EML3 fragmentum** készítéséhez a GCN4 (250.-281. aminosav) leucin-cipzárnak megfelelő DNS szakaszt egy módosított pET expressziós vektorba ültettük, BamHI és BglII restrikciós enzimek segítségével. Ez a vektor N-terminális GST-fúziós fehérjék expresszióját teszi lehetővé, melyekről a GST lehasítása TEV proteázzal lehetséges. Ebbe a vektorba ültettük be ezután az EML3 kötőmotívumnak (Q32P44,

81.-88. aminosav), illetve a négy aminosavas linker (GGSG) szekvenciának megfelelő szintetikus DNS darabot.

A munka során készített DNS konstrukciók adatait az 1. táblázat tartalmazza. A konstrukciók többségét Hódi Zsuzsa és Rapali Péter kollégáim készítették.

6.2. Fehérje expresszió és tisztítás

A fehérje expresszió a dimer EML3 fragmentum esetén *E. coli* BL21-(DE3) Star sejtekben (Novagen) történt, míg minden egyéb esetben BL21-(DE3) Rosetta (Novagen) sejteket használtunk. A dimer EML3 fragmentum esetén a sejteket LB médiumban, 37 °C-on, 200 RPM rázatás mellett növesztettük $OD_{\lambda=600nm}=1,5$ -ig, majd 0,5 mM IPTG-vel (Sigma) indukáltuk a fehérje-expressziót. A sejtszuspenziót közvetlenül még az IPTG hozzáadása előtt 18 °C-ra hűtöttük, majd további kb. 12 órán keresztül ráztattuk. A többi fehérje esetén a sejteket 2YT médiumban 37 °C-on, 200 RPM rázatás mellett növesztettük addig, amíg a mért optikai denzitás el nem érte a 0,6-ot. Az indukciót 1mM IPTG (Sigma) hozzáadásával végeztük. Ezután újabb három órás inkubáció következett a fenti kondíciók mellett. A GST-fúziós fehérjéket glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences), a His-tag-fúziós fehérjéket Ni^{2+} -affinitás (*Profinity IMAC Ni-charged resin*, Bio-Rad) kromatográfiás oszlopon tisztítottuk, majd az affinitás-címkéket trombinos emésztéssel távolítottuk el, kivéve a dimer EML3 fragmentumot, ahol TEV proteázt (158) használtunk. A DYNLL1, DYNLL2, DYNLL2 S88E mutáns, és a Bmf fehérjéket tovább tisztítottuk HiTrapQ anion cserélő oszlopon (Amersham Biosciences). Az elúció lineáris sókoncentráció-gradiens segítségével történt. A leucin-cipzár fúziós Bmf és EML fragmentumokat RP-HPLC-vel, Jupiter 300 C18-as reverz fázisú oszlopon (Phenomenex) tisztítottuk. A fehérjeoldatok koncentrációját a 280 nm-en mért abszorbancia, illetve számított extinkciós együtthatók segítségével határoztuk meg. A tisztított fehérjék molekulatömegét minden esetben tömeg-spektrometriával ellenőriztük.

6.3. Peptidok szintézise és tisztítása

A kristályosításhoz használt miozin Va peptidet (Ac-IQPKDDKNTMTDST-NH₂; N-terminálison acetilált, C-terminálison amidált), melynek szekvenciája a DYNLL kötőhelynek megfelelő (Uniprot: Q96FJ2, 1280.-1293. aminosav), a Peptide 2.0 Inc cégtől (Chantilly, USA) vásároltuk. A Bmf (TSQEDKATQTL), az nNOS (EMKDTGIQVDRDL), valamint az acetilált EML3 (Ac-SRGTQTE) peptid szintézisét

tanszékünkön Dr. Patthy András végezte. A szilárd-fázisú szintézis egy ABI 431A automata peptid-szintetizáló berendezés segítségével Fmoc (9-fluorenil-metiloxi-karbonil-) védőcsoport használatával történt. Az N-terminális végén fluoreszcein-jelölt Bmf-peptid esetén a hasítási lépés előtt 5(6)-karboxifluoreszceint kapcsoltunk az N-terminális amino-csoporthoz. A peptidek tisztítása HPLC-vel, Jupiter 300 C18-as reverz-fázisú oszlopon (Phenomenex) történt. A kiindulási liofilizált szintézistermékeket víz:trifluoecetsav (99,9%:0,1%) elegyben „A” oldottuk fel. Az oszlopra, melyet előzőleg „A” eleggyel hoztunk egyensúlyba, felvittük a mintát, majd „A”-val történő mosás után az elúciót lineáris „B” (acetonitril: trifluoecetsav; 99,9%:0,1%) gradienssel (0%-tól 100%-ig; 1%/min) valósítottuk meg. A peptidoldatok koncentrációját aminosav-analízis segítségével határoztuk meg (Dr. Medzihradszky Kálmánné, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport). A tisztított peptidek molekulatömegét minden esetben tömeg-spektrometriával ellenőriztük, melyben Dr. Kékesi Katalin (ELTE, Proteomikai Csoport) volt segítségünkre.

6.4. Izotermális titráló kalorimetria (ITC)

A titrálásokat 3 mM 2-merkaptotanol tartalmú PBS-ben végeztük (299 K, pH=7,4), Microcal VP-ITC kaloriméter segítségével. A DYNLL1 és DYNLL2 kezdeti koncentrációja 30 μ M volt ezekben a kísérletekben. A különböző ligandumokkal történő titrálások során – a kötések erősségétől függően – 1,5-5-szörös végső ligandum felesleget alkalmaztunk. Egy titrálás – a kötése erősség, illetve a kötőpartner koncentrációjának függvényében – kb. 30-40 injektálási lépésből állt, melyek között 900 s telt el. Az oldatok hígulásából adódó hőváltozásokat kontroll kísérletek segítségével határoztuk meg, majd az így nyert adatokkal korrigáltuk a megfelelő méréseket. Az adatok feldolgozását, illetve a termodinamikai paraméterek meghatározását az Origin for ITC 5.0 (OriginLab) szoftverrel végeztük. Több kötődési modell tesztelése után arra a következtetésre jutottunk, hogy a legegyszerűbb, egy kötőhelyet feltételező modell („one site binding”; $A+B=AB$) minden esetben alkalmas a vizsgált rendszer leírására (Ami azt jelenti, hogy a DYNLL kötőárkai egyenértékűek, illetve jó közelítéssel egymástól függetlenek; lásd: függelék, 12.1.), így a továbbiakban az adatelemzést ennek a modellnek a segítségével hajtottuk végre. A termodinamikai paraméterek esetén a megadott hibák a modellillesztés hibái. A mérések kivitelezésében és a modellillesztésben Dr. Kardos József (ELTE, Biokémiai Tanszék) volt segítségünkre.

6.5. Felszíni plazmon rezonancia (SPR)

Az SPR (*Surface Plasmon Resonance*) kísérleteket Biacore 3000 készülék segítségével CM5-ös (karboximetil-) felszínen végeztük. A dimer myoVa és teljes Bmf (1.–159. a.s.) fehérjék kovalens immobilizálását amino-csoportokon keresztül, 25 °C-on végeztük az alábbiak szerint: A felszínnek aktiválását 50 mM N-hidroxiszukcinimid és 200 mM N-etil-N-dimetilaminopropil-karbodiimid tartalmú oldat 6 percen keresztül történő átáramoltatásával értük el. A fehérjeoldatokat 50 µg/ml-es koncentrációra hígítottuk 10 mM nátrium-acetát (pH 5,0) pufferrel, majd a felszín felett áramoltattuk 7 percen keresztül, 10 µl/min folyási sebességgel. A reakció után szabadon maradt reaktív helyek blokkolását ezután 35 µl 1 M-os etanolamin (pH 8,5) injektálásával végeztük. A kötődési reakciók követéséhez a DYNLL2-t illetve a DYNLL2 S88E mutáns SPR pufferben (10 mM HEPES (pH 7,4), 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20) hígítottuk különböző koncentrációkra, majd ezeket az oldatokat áramoltattuk az immobilizált fehérjékkel burkolt, illetve a pusztán etanolaminnal blokkolt kontroll felszínnek felett 10 µl/min sebességgel 15 percen keresztül, miközben a berendezés az RU (*Response Unit*) értékeket rögzítette. A kialakult komplexek disszociációjának követéséhez a felszíneket SPR pufferrel, 15 percig mostuk. A mért RU értékeket korrigáltuk a kontroll felszínen mért értékekkel. A kinetikai paramétereket (k_{on} , k_{off} : asszociációs és disszociációs sebességi állandó) és a számított disszociációs állandót (K_d) a BIAevaluation 3.1 szoftver segítségével határoztuk meg. A legegyszerűbb kötődési modellt használtuk, mely 1:1 kötődést feltételez ($A+B=AB$; *1:1 Langmuir interaction model*). A mérések kivitelezésében és a modellillesztésben Bécsi Bálint és Dr. Erdődi Ferenc (Debreceni Egyetem, Orvosi Vegytani Intézet) voltak segítségünkre.

6.6. Fluoreszcencia anizotrópia

Egyes, Bmf-fel folytatott titrálások esetén fluoreszcencia anizotrópia jel segítségével követtük nyomon a komplexképződést. A méréseket 23 °C-on, 3 mM 2-merkaptóetanolt tartalmazó PBS-ben végeztük. FLS920 spektrofluorimétert (Edinburgh Instruments) használtunk, melyben a 494 nm-es gerjesztő fényt egy CW 450W xenon lámpa adta. Az emittált fényt 540 nm-en detektáltuk. Fluoreszcein-jelölt Bmf peptidet (6.3. fejezet) titráltunk DYNLL2-vel, illetve DYNLL2 S88E mutánssal. A titrálási sorok összemérésénél a Bmf koncentrációja minden mérési pontban állandó, 818 nM

koncentráció függvényében, majd (feltételezve a legegyszerűbb kötődési modellt: $A+B=AB$) az alábbi egyenlet illesztésével határoztuk meg a disszociációs állandót:

$$A = A_{\min} + (A_{\max} - A_{\min}) \frac{(K_{d,eq} + [D]_0 + [B]_0) - \sqrt{(K_{d,eq} + [D]_0 + [B]_0)^2 - 4[D]_0[B]_0}}{2[B]_0}$$

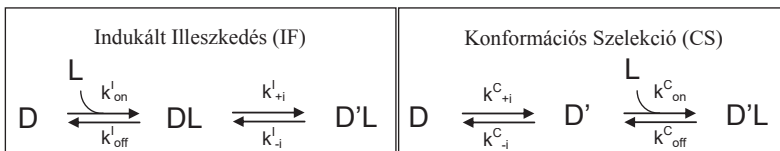
Az egyenletben „ $K_{d,eq}$ ” a látszólagos disszociációs állandó; „ $[D]_0$ ” a DYNLL2 teljes koncentrációja; „ $[B]_0$ ” a fluoreszcein-jelölt Bmf teljes koncentrációja; „ A ” a reakcióelegyre meghatározott anizotrópia; „ A_{\min} ” és „ A_{\max} ” az anizotrópia szélsőértékei, melyek leírják a minta azon két állapotát, amikor a fluoreszcein-jelölt Bmf teljes mennyisége szabad, illetve DYNLL-hez kötött.

6.7. Megállított áramlások fluoreszcens spektroszkópia (*Stopped-flow*)

Tranziens kinetikai méréseinket KinTek SF-2004 berendezés segítségével végeztük. A fluoreszcens jelet a DYNLL1-ben és DYNLL2-ben is jelen levő, egyetlen triptofán oldallánc (Trp54) szolgáltatta. Fényforrásként xenon lámpát használtunk. A DYNLL izoformákat 297 nm-en (4 nm-es sávszélesség mellett) gerjesztettük. Az emissziós oldalon egy 340 nm-es interferencia szűrőt alkalmaztunk. A fehérjét a kísérletek előtt 3 mM 2-merkaptóetanolt tartalmazó PBS-sel szemben dializáltuk kétszer, illetve a liofilizált peptideket is ebben a pufferben oldottuk fel. A méréseket 23 °C-on végeztük. A két reagenst (DYNLL és kötőpartnere) 1:1 térfogatarányban kevertük össze úgy, hogy a DYNLL koncentrációja (a keverés előtt) minden esetben 3 μ M volt, míg a partnereinek koncentrációját 1 és 1000 μ M között változtattuk. Minden keverési kísérletet legalább háromszor végeztünk el, majd a nyert adatokat átlagoltuk. Kontroll kísérletként meghatároztuk a fluorofór gerjesztő fény hatására történő bomlásának ütemét, majd ennek megfelelően korrigáltuk a többi mérést. Az adatok kezdeti analizését a következő kettős exponenciális függvény illesztésével végeztük: $I = A_1 e^{-k_{obs1}t} + A_2 e^{-k_{obs2}t} + C$, ahol „ I ” a fluoreszcencia intenzitás; „ A_1 ” és „ A_2 ” a gyors és a lassú fázis amplitúdója; „ k_{obs1} ” és „ k_{obs2} ” a gyors és a lassú fázis látszólagos sebességi állandója; „ t ” az idő; „ C ” pedig egy konstans. A kezdeti analízis után modellépítést, különböző reakciómechanizmusok tesztelését, globális illesztést, a sebességi állandók és konfidencia intervallumok meghatározását a KinTek Global Kinetic Explorer 2.2.563 szoftverrel (159, 160) végeztük. A fluoreszcencia intenzitások legalább három mérésekből számított átlagait a reagens koncentráció és az idő függvényében importáltuk a programba, az egyes pontokhoz tartozó

szórás értékeket is megadva. Két lehetséges minimális (legegyszerűbb) modellt építettünk, melyek egyformán alkalmasnak tűntek a rendszer viselkedésének leírására (5. ábra):

- Az indukált illeszkedés, vagy „IF” modell (*Induced Fit*) egy reverzibilis kötődés lépés után egy szintén reverzibilis izomerizációs lépést feltételez, vagyis a kötődés során létrejövő komplex konformációváltozást szenved el.
- A konformációs szelekció, vagy „CS” modell (*Conformational Selection*) azt feltételezi, hogy a DYNLL két konformációs állapotban létezhet, melyek között izomerizációs egyensúly áll fenn. Partner csak az egyikhez képes (reverzibilisen) kötődni, ezáltal eltolva az egyensúlyt.



5. Ábra: A kinetikai adatok analizésére használt indukált illeszkedés és konformációs szelekció modellek (D: DYNLL, L: ligandum; D': DYNLL a konformáció változás után). A sebességi állandók (k) esetén felső indexben a modell (I: IF, C: CS), alsó indexben a reakciólépés (on és off: komplex képződés és disszociáció, +i és -i: izomerizáció) megjelölése látható.

Mindkét modell esetén mindkét lépés együtt járhat a DYNLL triptofán fluoreszcencia jelének változásával. A modellek globális illesztése során, kiküszöbölendő a lámpa fényintenzitás ingadozásait, skálafaktorokat alkalmaztunk minden adatsorra. A modellek legjobb illeszkedésének keresése során az algoritmust többször, a paraméterek eltérő kiindulási értékeit beállítva futtattuk le. A paraméterek hibáinak becslését a FitSpace explorer (160) alprogrammal végeztük, amely felső és alsó korlátokat ad minden paraméterre. A számított felső és alsó korlátokat a program úgy határozza meg, hogy a paramétereket páronként fixálja különböző, az optimálistól eltérő értékeken, majd a fennmaradó paramétereket szabadon változtatva illeszt, végül meghatározza a χ^2 értéket. Ez annál nagyobb, minél messzebb fixáltuk a paraméter párt az optimális értékektől. A felső és alsó korlátok a paraméterek azon értékeit jelentik, ahol a χ^2 értéke a (legjobb illeszkedésre számított) minimális érték 1,1-szerese (160). A kísérletek során és a modellillesztéseknél Dr. Kovács Mihály (ELTE, Biokémiai Tanszék) volt segítségünkre.

6.8. Fehérje krisztallográfia és röntgendiffrakció

A krisztallográfiai kísérletek előtt a DYNLL2 oldatot kétszer dializáltuk TBS-ben (20 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 3 mM NaN₃, 5 mM DTT, pH 7,6), majd

koncentrációját ultraszűrőssel (*Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-3 membrane, Millipore*) növeltük kb. 4 mM-ig. A tisztított és liofilizált Ac-SRGTQTE peptidet, a dimer VSRGTQTE peptidet, illetve a miozin Va peptidet (Ac-IQPKDDKNTMTDST-NH₂) peptidet TBS-ben oldottuk fel, majd DYNLL2 oldattal kevertük össze, úgy, hogy a peptidek a DYNLL-hez képest moláris feleslegben legyenek. Az így létrejött komplexek oldataiban a DYNLL : peptid koncentráció arány az Ac-SRGTQTE és a miozin Va peptidek esetén 1.5 mM : 2.0 mM, a dimer VSRGTQTE esetén 1.2 mM : 1.3 mM volt. A kristályokat függőcsepp-módszerrel növesztettük 293 K hőmérsékleten. A cseppeket 2 µl fehérjeoldat és 2 µl kristályosító oldat összekeverésével állítottuk elő, kivéve a miozin Va esetén, ahol ez az arány 2.5 µl : 1 µl volt. Az optimális kristályosító oldat összetétele az Ac-SRGTQTE-komplex esetén: 31% PEG4000, 0.4 M CH₃COONH₄, 0.1 M CH₃COONa, pH 4,6, a dimer VSRGTQTE esetén: 20% PEG8000, 0.2 M MgCl₂, 0.1 M TRIS, pH 7,0, a miozin Va esetén 1.8 M (NH₄)₂SO₄, 0.02 M CoCl₂, 0.1M MES pH 6,5 volt. A kristályok növekedése néhány napot vett igénybe. Miután a kívánt méretet elérték, néhány kristályt 20% glicerint tartalmazó kristályosító oldatba áztattunk kb. 1 percre, majd folyékony nitrogénben fagyasztva tároltuk őket a diffrakciós adatgyűjtés megkezdéséig.

A röntgendiffrakciós adatgyűjtés az Ac-SRGTQTE-komplex és a miozin Va-komplex esetén 100 K hőmérsékleten, ADSC Q315R CCD detektor használatával történt az ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*) ID29-es röntgensugár-forrásánál ($\lambda = 0.93 \text{ \AA}$). Az adatok indexelése, integrálása, skálázása (1.31 Å ill. 1.85 Å felbontásig) az XDS és az XSCALE (*161*) programokkal történt. A meghatározott tércsoport előbbi esetben: P₂₁₂₁₂₁, az elemi cella méretei: a= 35.6 Å, b = 64.0 Å, c= 151.8 Å, míg utóbbi esetben P₆₁₂₂, illetve: a=b=45.16 Å, c=204.01 Å voltak.

Az adatgyűjtés a dimer (GS)VSRGTQTE-DYNLL2 komplex esetén „házi” röntgensugár-forrás (Cu, K α sugárzás, $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$), valamint Rigaku R-AXIS IV++ detektor használatával történt. Az adatok indexelése, integrálása, skálázása (2.9 Å felbontásig) a CrystalClear szoftverrel (Rigaku) történt. A meghatározott tércsoport: P₂₁₂₁₂₁, az elemi cella méretei: a= 53.8 Å, b = 68.4 Å, c= 101.7 Å voltak.

Az Ac-SRGTQTE-DYNLL2 és a miozinVa-DYNLL2 komplexek szerkezetét molekuláris helyettesítés módszerrel, a CCP4 6.1.2 programcsomag (*162, 163*) PHASER programjával (*164*) oldottuk meg. Keresőmodellnek az 1CMI (26) szerkezetet választottuk, majd az automatikus modellépítés az Arp/wArp (*165*) programmal történt a DYNLL2 monomer és a szintetikus peptidek szekvenciáinak használatával. A kezdeti modelleken

több, iteratív cikluson keresztüli manuális javítást, illetve finomítást hajtottunk végre a Coot (166), valamint a CCP4 6.1.2 programcsomag (162, 163) Refmac5 programjának segítségével. Az Ac-SRGTQTE-DYNLL2 komplex modell finomításának legutolsó lépéseinél a fehérjeatomok esetén anizotróp hőmérsékleti faktorokat vezettünk be, ami az R-faktor és R_{free} értékeket egyaránt csökkentette, előbbi 2,4% utóbbit 1,5%-kal. Az automatikus modellépítés közben 419 vízmolekulát építettünk be. A végső szerkezeti modell esetén $R_{\text{cryst}} = 12.1\%$ és $R_{\text{free}} = 15.6\%$. A miozin Va-DYNLL2 komplex modell finomítása közben egy kobalt(II)-iont, illetve 295 vízmolekulát építettünk be. A végső szerkezeti modell esetén $R_{\text{cryst}} = 19.1\%$ és $R_{\text{free}} = 22.9\%$.

A dimer (GS)VSRGTQTE-DYNLL2 komplex szerkezetét a CCP4 6.1.2 programcsomag (162, 163) MOLREP programjával (167) oldottuk meg. Keresőmodellnek a már előzőleg megoldott Ac-SRGTQTE-DYNLL2 komplex szerkezetét választottuk. A modellépítést a Coot (166) programmal végeztük. A modell finomítása a Refmac5 (163) programmal történt a „restrained maximum-likelihood” módszer és „TLS” paraméterek (168) használatával. A finomítás közben nem-krisztallográfiai kényszerfeltételeket kellett alkalmaznunk a DYNLL2 molekulák, a hozzájuk kötődő peptidek, valamint a *coiled-coil* régiók esetén. A végső modell 1999 fehérjeatomot és 40 vízmolekulát tartalmaz. Az $R_{\text{cryst}} = 25.0\%$, az $R_{\text{free}} = 29.5\%$. A szerkezetek sztereokémiai kiértékelését WHATCHECK (169) és PROCHECK (170) programokkal végeztük.

A szerkezetek a PDB adatbázisban a 2XQQ, 3P8M és 4AEG kódszámok alatt érhetőek el. A krisztallográfiai adatokat, valamint a modellek finomításának statisztikai adatait a függelékben (12.2.), táblázatos formában összefoglaltam.

Saját részvételem ezekben a kísérletekben a minták előkészítésére, a kristályosításra, kristályok ellenőrzésére, illetve a modellek manuális finomítására korlátozódott. Az adatgyűjtésben, illetve a modellépítésben Weixiao Y. Wahlgren, Dr. Katona Gergely (Department of Chemistry, University of Gothenburg, Svédország) és Dr. Harmat Veronika (ELTE, Kémiai Intézet) voltak segítségemre.

7. Eredmények

7.1. A DYNLL1 és DYNLL2 izoformák termodinamikai és kinetikai összehasonlítása

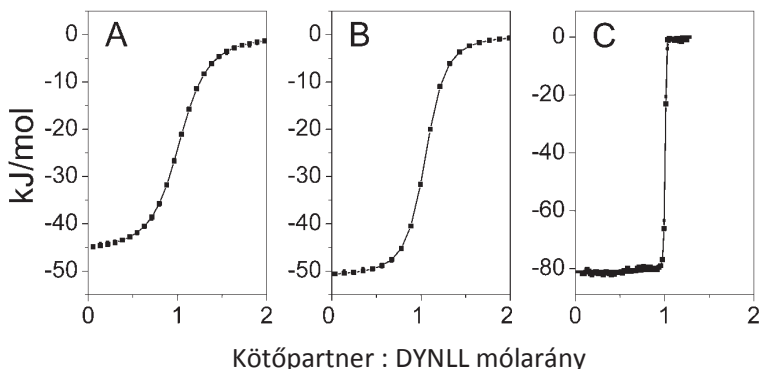
A két izoforma kötődési tulajdonságainak összehasonlításához két partnert választottunk, a Bmf-et és az nNOS-t. *In vivo* az nNOS a DYNLL1 (12), míg a Bmf a DYNLL2 kötőpartnerre (22). Az nNOS és a Bmf DYNLL kötőmotívumának szekvenciája jelentősen különböző, előbbi a XGI/VQVD-családba (D₄T₃G₂L₁Q₀V₁D₂), utóbbit a KXTQTX-családba (D₄K₃A₂T₁Q₀T₁D₂) sorolhatjuk. Egy lehetséges hipotézis, hogy a két izoforma partner preferenciájának oka éppen a motívumok szekvenciájában keresendő. Ez esetben *in vitro* is szelektív kötődést kellene tapasztalnunk.

Hogy ellenőrizzük, hipotézisünk érvényességét, mindkét izoforma mindkét partnerhez (a kötőmotívumoknak megfelelő szintetikus peptidekhez) történő kötődésének termodinamikai és kinetikai paramétereit meghatároztuk ITC-vel illetve megállított áramlásos fluoreszcens spektroszkópiával (*stopped flow*). Mindkét partner mindkét izoformához kötődött. Meglepően hasonló disszociációs konstansokat tapasztaltunk az egyes partnereknél (2. táblázat, 6. ábra). (A kinetikai konstansok részletes magyarázatát lásd a 7.5. fejezetben!)

Partner	Izoforma	$K_{d,eq}$ (nM)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kJ mol ⁻¹)	k_{on}^C (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off}^C (s ⁻¹)
Bmf (DKATQTL)	DYNLL1	1050±40	-46,1±0,2	11,9	10400	-
Bmf (DKATQTL)	DYNLL2	735±22	-51,3±0,1	16,1	21700	-
Bmf (dimer)	DYNLL2	3,46±0,46	-81,1±0,1	32,7	13000	-
nNOS (DTGIQVD)	DYNLL1	7000±230	-18,7±0,1	-10,8	46800	4,22x10 ⁻¹
nNOS (DTGIQVD)	DYNLL2	5410±150	-22,3±0,1	-7,91	58400	4,37x10 ⁻¹
miozin Va (DKNTMTD)	DYNLL2	8850±670	-23,9±0,4	-4,93	6590	1,03x10 ⁻¹
miozin Va (dimer)	DYNLL2	37±5	-28,5±0,1	-13,9	4020	-
Pak1 (DVATSPI)	DYNLL2	42700±5300	-21,5±4,1	-3,48	16400	6,41x10 ⁻¹

2. táblázat: A különböző partnerek DYNLL kötési reakcióinak termodinamikai és kinetikai paramétere. A $K_{d,eq}$ (látszólagos disszociációs állandó, lásd: függelék, 12.3.), ΔH (entalpiaváltozás) és $-T\Delta S$ (T : hőmérséklet, ΔS : entrópiaváltozás) mennyiségeket ITC mérések (6. ábra), míg a k_{on}^C (komplex képződés) és k_{off}^C (komplex disszociáció) sebességi állandókat megállított áramlásos fluoreszcens spektroszkópiai kísérletek alapján határoztuk meg. (9. ábra, függelék: 12.4.) A feltüntetett hibák minden esetben az illesztések hibái. A dimer partnerek, valamint a Bmf esetén k_{off}^C állandók olyan kicsi értékek (* $k_{off}^C \leq 10^{-3}$ s⁻¹), hogy a használt módszerrel nem tudtuk megfelelő pontossággal meghatározni őket, így ebből a táblázatból hiányoznak. (A részletes kinetikai adatokat, beleértve az összes k_{on}^C and k_{off}^C értékre vonatkozó becslést, ezek hibáit, illetve a számított konfidencia-intervallumokat lásd: függelék, 12.5.)

A DYNLL1 mindkét partner esetén kicsit gyengébb és lassabb kötődést mutatott (pl. a Bmf esetén: DYNLL1: $K_{d,eq} \approx 1 \mu M$, $k_{on}^C = 10,4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; DYNLL2: $K_{d,eq} \approx 0,7 \mu M$, $k_{on}^C = 21,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), azonban ezek a minimális különbségek bizonyosan nem magyarázhatják az *in vivo* tanulmányokban leírtakat. Ha tehát létezik izoforma specifikus partner szelekció, és ez nem a kötőmotívumok szekvenciájában kódolt, akkor fel kell tételeznünk valamilyen egyéb „faktor” (pl. egy fehérje) szerepét, mely valamilyen módon, pl. kötődve az egyik DYNLL izoformához, befolyásolja a partner-preferenciát.



6. ábra: A komplexképződési reakciók termodinamikai paramétereit ITC módszerrel határoztuk meg. Adott koncentrációjú ($30 \mu M$) DYNLL oldatot titráltunk a különböző kötőpartnerekkel, és mértük a reakciók során bekövetkező hőváltozásokat. A monomer Bmf fragmentum DYNLL1-hez (A) illetve DYNLL2-höz (B) kötődését vizsgálva szembetűnő a titrálási görbék hasonlósága. A disszociációs konstans előbbi esetben $0,74 \mu M$, míg utóbbi esetben ehhez igen közeli érték, $1,05 \mu M$ volt. A ΔH és ΔS értékek csak minimális eltéréseket mutattak (2. táblázat). A dimer Bmf fragmentum (C) kötődése a DYNLL2-höz jelentősen eltérő titrálási görbét eredményezett. Itt a disszociációs állandó $\sim 3,5 \text{ nM}$ volt, ami ~ 200 -szor erősebb kötődést jelent a monomer Bmf-hez viszonyítva.

Tekintettel arra, hogy a két izoforma *in vitro* igen hasonló viselkedést mutatott, a további mérésekhez már csak a DYNLL2-t használtuk.

7.2. A különböző kötőmotívumok összehasonlítása

A DYNLL, mint csomóponti fehérje, a sejtben egyszerre több partnerével is találkozik, melyek ugyanazért a kötőhelyért versengenek. Az a nagyfokú diverzitás, melyet a kötőmotívumok szekvenciáinak körében tapasztalunk, azt sugallhatja, hogy az egyes partnerekre érvényes disszociációs állandók különbségei – természetesen a lokális

koncentráció-viszonyokkal együtt – határozhatják meg a DYNLL partnerek közötti megoszlását. Szükséges tehát vizsgálnunk, hogy a szekvenciák különbségei a komplexképződési reakciók termodinamikáját és/vagy kinetikáját tekintve milyen különbségeket jelentenek.

A termodinamikai és kinetikai paramétereket az előző fejezetben említett módszerekkel (ITC, *stopped-flow*) határoztuk meg, négy partner (Bmf, nNOS, myoVa, Pak1) kötőmotívumának megfelelő, négy szintetikus peptid segítségével (2. táblázat, 6. ábra, továbbá: függelék, 12.5.). A Bmf (KATQTL), mely szekvenciája alapján az első konszenzus-osztályba tartozik, kötődött legerősebben ($K_{d,eq} \approx 0,7 \mu\text{M}$) a DYNLL2-höz. Az nNOS (TGIQVD), mely a második konszenzus-osztályba sorolható, kissé gyengébben kötődött ($K_{d,eq} \approx 5 \mu\text{M}$), míg a nem kanonikus myoVa érdekes módon ehhez igen hasonló affinitással ($K_{d,eq} \approx 9 \mu\text{M}$). A Pak1 peptid, melynek szekvenciája (VATSPI) a leginkább eltér a konszenzus osztályoktól, mutatta a leggyengébb kötődést ($K_{d,eq} \approx 40 \mu\text{M}$). Érdekes, hogy amíg a DYNLL2 kötődése az nNOS-sal, myoVa-val, illetve Pak1-gyel entropikusan és entalpiikusan is kedvező, addig a Bmf-fel történő interakció entalpia vezérelt és entropikusan kedvezőtlen. Ennek megfelelően utóbbi esetben az entalpiaváltozás hozzájárulása a kötődési szabadenergiához (ΔG) sokkal nagyobb, mint a többi partner esetén.

A kötődési sebességi állandók $6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $58 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ közé estek. A disszociációs sebességi állandók az nNOS, myoVa és Pak1 esetén $0,1 \text{ s}^{-1}$ és $0,6 \text{ s}^{-1}$ közötti tartományban voltak, viszont a Bmf meglepően lassú disszociációt mutatott. Itt a disszociációs sebességi állandó az előbbi tartománynál két nagyságrenddel kisebb ($\sim 0,002 \text{ s}^{-1}$, lásd: függelék 12.5.) volt.

Összefoglalva az eddigieket kijelenthetjük, hogy a különböző osztályokba tartozó peptidek hasonló erősséggel ($K_{d,eq}$: $10^{-6} - 10^{-5} \text{ M}$ körül) kötődnek a DYNLL2-höz, bár – ahogy ezt az entalpia, entrópia és a kinetikai adatok mutatják – a kötődés mechanizmusa, illetve az interakciós mintázat a DYNLL2 és partnere között eltérő az egyes esetekben.

Felmerülhet a kérdés, hogy mennyire jól jellemezhetjük egy teljes fehérje kötődését a belőle származó rövid peptid paramétereinek meghatározásával. Éppen ezért egy független módszerrel, felszíni plazmon rezonanciával (SPR) meghatároztuk a majdnem teljes hosszúságú Bmf fehérje (1.-159. aminosav) DYNLL2-höz való kötődésének erősségét. A fehérje C-terminális végét, mely erősen hidrofób, és valószínűleg membrán-horgonyként funkcionál (171), oldhatósági okokból el kellett távolítanunk. A meghatározott disszociációs állandó $4 \mu\text{M}$ volt, ami igen jól egyezik a Bmf peptiddel mért

0.7 μM -os értékkel. Ez az eredmény megerősíti, hogy egyedül a rövid, lineáris kötőmotívum felelős a kötődésért, ez határozza meg annak erősségét, illetve, hogy nincs másodlagos kötőhely, legalábbis a Bmf esetén.

7.3. A partnerek dimer állapota a látszólagos affinitást nagyságrendekkel növeli

A DYNLL legtöbb ismert kötőpartnere (pl.: myoVa (36), DIC (172), nNOS (173, 174)) homodimereket alkot. A DYNLL elősegíti ezek dimerizációját, stabilizálja a dimer állapotot, ahogy ezt például a *Swallow*, a DIC vagy a myoVa esetén kísérletes munkák is igazolták (28, 39, 40, 139). Mivel a DYNLL általában dimer partnerekkel találkozik *in vivo*, fontos, hogy *in vitro* is tanulmányozzuk a bivalens partnerekkel történő interakciókat, pontosabb képet kapva ezek lehetséges biológiai szerepéről.

Kísérleteinkhez dimer kötőpartnerként a myoVa-nak egy stabil dimer fragmentumát választottuk. Ez a fragmentum két *coiled-coil* szakasz között egy szerkezet nélküli régiót tartalmaz, melyen belül található a DYNLL kötő régió. A *coiled-coil* szakaszok N- és C-terminális végére leucin-cipzárokat fuzionáltunk, melyek növelik a dimerek stabilitását. Korábban már kimutattuk, hogy egy hasonló, myoVa fragmentum, melynek csak az N-terminális végére fuzionáltunk stabilizáló leucin-cipzárt, monomer-dimer átmenetre vonatkozó disszociációs állandója 29 nM (39). A dimer, tehát bivalens myoVa kinetikai és termodinamikai konstansait stopped-flow és ITC módszerekkel határoztuk meg, majd összehasonlítottuk az előző fejezetben már tárgyalt, monomer myoVa peptid megfelelő értékeivel (2. táblázat).

A komplexképződés sztöchiometriája ITC mérések szerint a dimer myoVa-DYNLL2 interakció esetén 1:1 (vagyis dimer kötődik a dimerhez), míg a monomer peptid esetén 2:1 (tehát két monomer köt egy DYNLL dimerhez). A dimer partner esetén a látszólagos disszociációs állandó ~ 40 nM, ami ~ 250 -szer erősebb kötődést jelent a monomerhez képest ($K_{d,eq} \approx 9 \mu\text{M}$). A tapasztalt affinitás-erősödés valószínűleg nem más, mint az aviditás, mely jelenség leginkább az antitestekkel kapcsolatosan ismert. Lehetséges azonban az is, hogy a dimer myoVa fragmentum tartalmaz egy másodlagos DYNLL kötőhelyet. Ezt méréseink alapján kizárni ugyan nem tudtuk (sőt, a miozin Va - DYNLL komplex röntgendiffrakcióval illetve NMR-rel végzett vizsgálata a szigorúan értelmezett kötőmotívum környékén található néhány aminosav kötődéshez való gyenge hozzájárulására utal; lásd: 7.7. fejezet), de készítettünk egy mesterségesen dimerizált

partnert, melynek segítségével az aviditás jelenségét „tisztán” tanulmányozhattuk. Ehhez a Bmf kötőszekvenciáját egy négy aminosavas linker segítségével leucin cipzárhoz kapcsoltuk. Azért épp a Bmf-re esett választásunk, mert ez azon kevés ismert partnerek egyike, mely ismereteink szerint nem tartalmaz dimerizációért felelős motívumot. (Az optimális linkerhosszúságot *in silico* tervezéssel határoztuk meg, melyet kísérletes validálás követett.) Az így nyert mesterséges fehérje bizonyosan nem tartalmaz másodlagos DYNLL kötőhelyet. A dimerizált, illetve a monomer Bmf disszociációs állandóit (dimer: $K_{d,eq} = 3 \text{ nM}$; monomer: $K_{d,eq} \approx 0,7 \text{ }\mu\text{M}$) összehasonlítva, a myoVa-nál tapasztalható hasonló mértékű, ~200-szoros affinitás-növekedést láthatunk (2. táblázat, 6. ábra), ami megerősíti, hogy mindez pusztán az aviditás jelenségével is magyarázható.

Ahhoz, hogy további bizonyítékot szerezzünk aviditás-hipotézisünk érvényességére, meghatároztuk a dimer myoVa fragmentum kinetikai konstansait. (Lásd: 7.5. fejezet) Ismert ugyanis, hogy aviditás esetén a látszólagos disszociációs sebességi állandó (k_{off}) csökken, míg a kötődési sebességi állandó (k_{on}) alig változik (175-178). Stopped-flow módszerrel sikerült meghatároznunk a k_{on} értékét, de a k_{off} -ot csak igen nagy bizonytalansággal (2. táblázat, lásd még: függelék 12.4. és 12.5.). Ennek oka az, hogy a k_{off} olyan kicsi érték, amire az adott kísérleti elrendezésben pontos becslést tenni nem lehetséges. A csökkenés ténye viszont a nagy bizonytalanság ellenére is egyértelmű. Hogy pontosabb becslést tudjunk tenni a kinetikai konstansokra, a dimer myoVa fragmentum DYNLL2-vel történő interakcióját SPR-rel is vizsgáltuk. (3. táblázat, 7. ábra). A dimer myoVa fragmentumot kovalensen immobilizáltuk, míg analitként különböző koncentrációkban DYNLL2-t használtunk. Ezekben a kísérletekben a komplex disszociációját is jól tudtuk követni, így vált lehetségessé a paraméterek pontosabb becslése. Eredményeink szerint a k_{off} ~450-szer kisebb a dimer myoVa esetén, mint a monomernél, míg a k_{on} csak kb. felére csökkent.

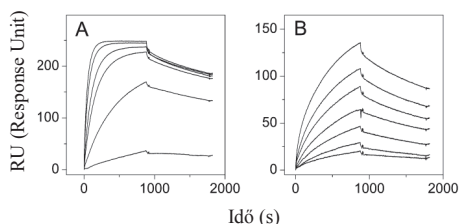
7.4. A DYNLL foszforilációjának modellezése – az S88E mutáns kötődése monomer és dimer partnerekhez

Szakirodalmi adatok szerint a DYNLL foszforilációja a 88. szerint oldalláncon gátolja a partnerek kötődését (14). Ez arra vezethető vissza, hogy a DYNLL dimerek foszforilált állapotban monomerekre disszociálnak, vagyis a monomer-dimer egyensúly eltolódik a monomerek irányába (46, 49). Ez akkor is igaz, ha a foszforiláció hatásának modellezése céljából a 88. szerint glutamátra cseréljük (DYNLL2 S88E mutáns) (46, 49).

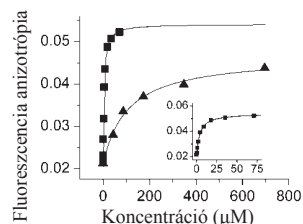
Mivel kvantitatív, összehasonlító adatok a foszforiláció partnerkötésre gyakorolt hatásaival, illetve az aviditás és a foszforiláció egyidejű következményeivel kapcsolatosan nem álltak rendelkezésünkre, így egy monomer és egy dimer partner kötődését is vizsgáltuk a DYNLL2 S88E mutánshoz, illetve a kontrollként használt vad típusú DYNLL2-höz.

DYNLL	Partner	$K_{d,eq}$ (nM)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
DYNLL2	Bmf (monomer)	3580± 400	-	-
DYNLL2 S88E	Bmf (monomer)	110000± 20000	-	-
DYNLL2	miozin Va (dimer)	50,0± 14,7	4840±1290	$2,24 \times 10^{-4} \pm 1,0 \times 10^{-5}$
DYNLL2 S88E	miozin Va (dimer)	2690± 860	147±64	$3,41 \times 10^{-4} \pm 4,5 \times 10^{-5}$

3. táblázat: A vad típusú és az S88E mutáns DYNLL2 kötődése egy monomer (Bmf), illetve dimer (miozin Va) partnerhez. A monomer Bmf fragmentum esetén fluoreszcencia anizotrópia titrálással (8. ábra), míg a dimer miozin Va fragmentum esetén SPR-rel (7. ábra) határoztuk meg a táblázatban szereplő állandókat.



7. ábra: A DYNLL2 (A) illetve DYNLL2 S88E mutáns (B) kötődését a dimer miozin Va fragmentumhoz felszíni plazmon rezonancia (SPR) módszerrel vizsgáltuk. A szenzor felszínére (CM5) közvetlenül, kovalensen immobilizáltuk a miozin Va fragmentumot. Az asszociációs fázisokban a DYNLL2-t 10 μM , 5 μM , 2 μM , 1 μM , 0,5 μM és 0,1 μM koncentrációban, míg az S88E mutánt 20 μM , 17,5 μM , 15 μM , 12,5 μM , 10 μM , 7,5 μM és 5 μM koncentrációban injektáltuk a felszínre. A disszociációs fázisokban fehérjementes pufferrel mostuk a felszínt. Az adatokat a legegyszerűbb, 1:1 kötődési modell ($A+B=AB$) segítségével analizáltuk. A két esetben a meghatározott disszociációs sebességi állandók nem mutattak nagy eltérést (DYNLL2: $2,24 \times 10^{-4} \pm 1,0 \times 10^{-5} s^{-1}$, DYNLL2 S88E: $3,41 \times 10^{-4} \pm 4,5 \times 10^{-5} s^{-1}$), viszont a DYNLL2 sokkal nagyobb látszólagos asszociációs sebességi állandót mutatott ($4840 \pm 1290 M^{-1} s^{-1}$), mint az S88E ($147 \pm 64 M^{-1} s^{-1}$). Utóbbi esetén ez minden bizonnyal annak lassú dimerizációjára vezethető vissza, mely szükséges a partnerkötéshez.



8. ábra: A monomer, fluoreszcein-jelölt Bmf peptid titrálása DYNLL2-vel (■) illetve DYNLL2 S88E mutánsal (▲). A reakciókat a fluoreszcencia anizotrópia jel változását mérve követtük nyomon. A fluoreszcenit 494 nm-en gerjesztettük, míg az anizotrópiát 540 nm-en határoztuk meg. A fluoreszcein-jelölt Bmf peptid koncentrációja 818 nM volt a titrálás minden pontjában. A vad típusú fehérje esetén az adatokat a jobb összehasonlíthatóság, illetve érthetőség kedvéért két különböző koncentrációtartományban is ábrázoltuk. A DYNLL2 esetén a látszólagos disszociációs állandó $3,58 \pm 0,4 \mu M$ volt. A DYNLL2 S88E sokkal gyengébb kötődést mutatott ($K_{d,eq} = 110 \pm 20 \mu M$).

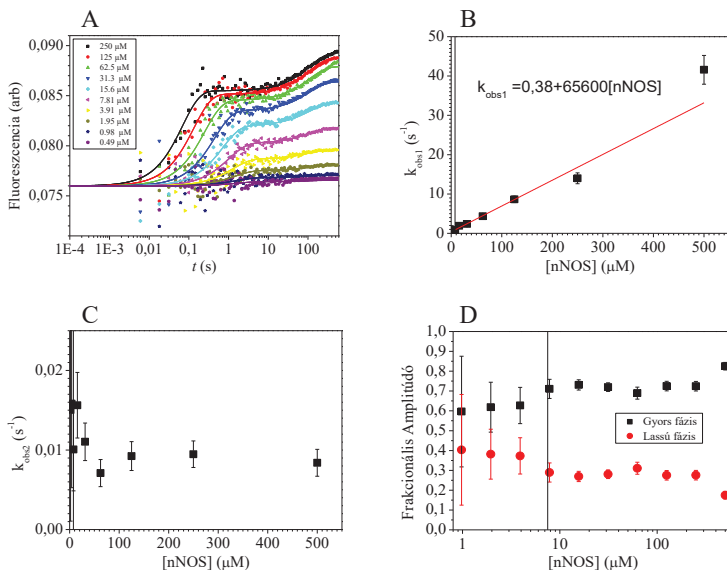
Monomer partnerként egy fluoreszcein-jelölt peptidet használtunk, mely a Bmf kötőmotívumának felelt meg. Ezt titráltuk a vad típusú, illetve a mutáns fehérjével. A kötődést a fluoreszcencia anizotrópia mérésével követtük nyomon. (3. táblázat, 8. ábra) Az adatok elemzésére mindkét esetben megfelelőnek bizonyult a lehető legegyszerűbb kötődési modell ($A+B=AB$), melynek segítségével meghatároztuk a látszólagos

disszociációs állandót. Ez az S88E esetén $\sim 110 \mu\text{M}$ volt, míg a vad típus esetén $\sim 3,5 \mu\text{M}$. A mutáció tehát kb. harmincszor gyengébb kötődéshez vezetett monomer partner esetén. Ilyen gyenge kölcsönhatásnak már valószínűleg nincs fiziológiai szerepe.

Mint azt már az előző fejezetben láttuk, a partnerek dimer állapotba aviditáshoz vezet. Ennek valószínűleg az S88E mutáns esetén is hatása van a látszólagos affinitásra. Hogy ezt a hipotézist ellenőrizzük, SPR módszerrel vizsgáltuk a DYNLL2 és a DYNLL2 S88E kötődését immobilizált, dimer myoVa fragmentumhoz (3. táblázat, 7. ábra). Ebben az esetben szintén nem láttuk jelét annak, hogy az egyszerű kötődési modellünknel bonyolultabb modellre lenne szükség az adatok elemzésénél. A látszólagos disszociációs állandó a DYNLL2 esetén 50 nM , míg a mutánsnál $2,7 \mu\text{M}$ volt. A mutáció tehát kb. ötvenszer gyengébb kötődést okozott. Ez főként a látszólagos kötődési sebességi állandó csökkenéséből adódott, míg a k_{off} érték szinte változatlan maradt. A látszólagos k_{on} csökkenése valószínűleg annak a következménye, hogy a kísérletben alkalmazott koncentráció tartományban a DYNLL2 S88E nagyrészt monomer állapotban van, viszont partnerekötésre csak a dimer állapotú fehérje képes, hiszen a kötőárhok csak itt alakulnak ki (46, 49). A komplexképződés során az eleve kis mennyiségű dimer S88E mennyisége gyorsan csökken, majd ezt követően az újabb dimerek már monomerekből képződnek, ami lassabb folyamat. Így a partnerekötés tulajdonképpen a monomer-dimer egyensúlyt tolja el a dimerképződés irányba.

7.5. A komplexképződés részletes kinetikai analízise - kétlépéses reakciómechanizmus

A DYNLL polipeptidláncában található egyetlen triptofán oldallánc (Trp54) fluoreszcencia intenzitás jele szerencsés módon partner kötődés hatására növekedést mutat, ami tranziens-kinetikai analíziseinket jelentősen megkönnyítette. Ha a DYNLL-nek és valamilyen kötőpartnerének oldatát megállított áramlásos fluoreszcens spektroszkópiái (*stopped flow*) kísérletekben gyorsan összekevertük, a Trp54 fluoreszcenciája kétfázisú átmenetet mutatott (9/A. ábra). Kettős exponenciális függvényeket illetve azokban az esetekben, ahol a reakciókat pszeudo-elsőrendűnek tekinthetjük (vagyis $5[\text{DYNLL}] \leq [\text{partner}]$) azt tapasztaltuk, hogy a gyors fázis látszólagos sebességi állandója (k_{obs1}) lineáris függést mutatott a partner koncentrációjától (9/B. ábra), míg a lassú fázis látszólagos sebességi állandója (k_{obs2}) nem mutatott koncentrációfüggést. Utóbbi értékek mindig egy szűk tartományon belül szóródtak: $0,01\text{--}0,06 \text{ s}^{-1}$ (9/C. ábra).



9. ábra: Tranziens kinetikai mérések. (A) A DYNLL fehérje 54. triptofán oldalláncának fluoreszcenciája a partner kötődésének hatására kétfázisú exponenciális növekedést mutat. Ezen az ábrán példaként a DYNLL1 izoforma nNOS peptiddel történő interakcióját láthatjuk. A többi vizsgált partner, bármely izoformával szemben ehhez nagyon hasonlóan viselkedett (függelék: 12.4.). A kísérletben a DYNLL1 mindig 1,5 μ M koncentrációban volt jelen, míg az nNOS peptid koncentrációját 250 μ M és 0,49 μ M között változtattuk (felező hígítási sor). A feltüntetett koncentrációk az oldatoknak a küvetákban történő gyors összekeverése után érvényes, monomerre vonatkoztatott értékek. Az említett triptofánt szelektíven gerjesztettük 297 nm-en, az emittált fényt 340 nm-en detektáltuk. A folytonos görbék mutatják be a Kintek Explorer Pro programmal az adatokra illesztett konformációs szelekció (CS) modellt, melynek segítségével a kinetikai konstansokat meghatároztuk (függelék: 12.5.). (B) Az adatok kezdeti elemzését kettős exponenciális függvények illesztésével végeztük, ami lehetővé tette a modellépítéshez nélkülözhetetlen, alapvető következtetések levonását. A gyors fázis látszólagos sebességi állandója (k_{obs1}) minden vizsgált reakció esetén lineáris függést mutatott a peptid koncentrációjától, ha a reakció pseudo-elsőrendűségének feltételei fennálltak (vagyis $5[DYNLL] \leq [partner]$; ezt a tartományt a B, C és D ábrákon a függőleges fekete vonaltól jobbra találjuk). Az egyenes illesztésénél az egyes pontokat a szintén ábrázolt hibákkal súlyozottan vettük figyelembe. (C) A lassú fázis látszólagos sebességi állandója (k_{obs2}) egy szűk tartományon belül szóródott (minden partner esetén 0,01 és 0,06 közötti értékek), vagyis a k_{obs1} -gyel ellentétben nem mutatott függést a peptid koncentrációjától. (D) Pseudo-elsőrendű körülmények között az amplitúdó változás ~70 %-ban a gyors, míg ~30 %-ban a lassú fázishoz volt köthető.

A tapasztaltak arra utalnak, hogy a megfigyelt fluoreszcencia változásokat a ligandummal történő másodrendű asszociációs reakción kívül egy elsőrendű reakciólépésre vezethetjük vissza, ami jelentheti például a szabad, vagy a ligand-kötött DYNLL konformációs változását, vagyis egyfajta izomerizációt. A teljes amplitúdó változás ~70%-a volt köthető a gyors, asszociációs lépéshez, míg ~30%-a a lassú, izomerizációs lépéshez, amennyiben a pszeudo-elsőrendűség feltételei fennálltak (9/D. ábra).

A kettős-exponenciális közelítésen kívül az adatokat két lehetséges minimális modell, az indukált illeszkedés (IF) és a konformációs szelekció (CS) globális illesztésével is elemeztük. (Lásd: 6.7 fejezet!). Az ezek segítségével meghatározott összes paraméter értéke a függelék 12.5. fejezetében található. Általánosságban elmondható, hogy a kötődési lépésre vonatkozó kinetikai paramétereket sikerült megbízhatóan meghatározni, kivéve a nagy affinitással kötő dimerekre, illetve a Bmf-re vonatkozó k_{off} értékeket, ahol a disszociáció meglepően lassú volt. Az izomerizációs lépésre vonatkozó paraméterek esetén a bizonytalanság jóval nagyobb (függelék, 12.5.). A kötődési lépésre vonatkozó k_{on} és k_{off} értékek figyelemre méltó egyezése a két modell esetén szintén azt mutatja, hogy a mért adatok segítségével ezeket a paramétereket pontosan meg lehet határozni, vagyis ezekre vonatkozóan elegendő információval rendelkezünk, továbbá, hogy az izomerizációs lépések bizonytalansága a kötődési lépések paramétereire kevésbé van hatással.

A dolgozatomban más fejezeteiben feltüntetett kinetikai paraméterek, mindegyike a CS modell segítségével meghatározott érték, ugyanis ez némileg jobb illesztéseket adott, mint az IF modell. (További indoklás a 8.5. fejezetben!)

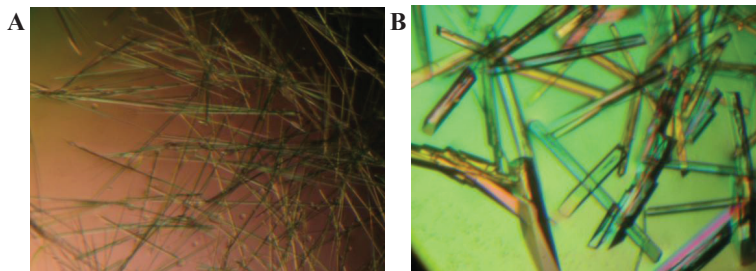
A teljes folyamatra, vagyis a kötődési és az izomerizációs lépésre is vonatkozó, látszólagos disszociációs állandókat ($K_{\text{d,eq}}$, magyarázat a függelék 12.3. fejezetében) ITC kísérletekben nagy pontossággal határoztuk meg. (2. táblázat, 6. ábra) Ezeket az értékeket a négy kinetikai állandó ismeretében, pusztán a gyorskinetikai mérések eredményeiből is kiszámíthatjuk. Az IF modell esetén $K_{\text{d,eq}}=1/(K_b(1+K_i))$, míg a CS modell esetén $K_{\text{d,eq}}=(1+K_i)/(K_bK_i)$ (Lásd: függelék, 12.3. fejezet), ahol $K_b=k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ (kötődési lépés) és $K_i=k_{+i}/k_{-i}$ (izomerizációs lépés) (függelék, 12.5.). Az így számított, illetve ITC-vel mért $K_{\text{d,eq}}$ értékek jó egyezést mutattak, kivéve a nagy affinitású partnereket, ahol a disszociációs sebességi állandókat csak igen nagy pontatlansággal tudtuk meghatározni.

7.6. Az eddig leírt legnagyobb affinitású kötőmotívum DYNLL2-vel alkotott komplexének atomi felbontású szerkezete

Krisztallográfiai kísérleteinkhez a DYNLL2 izoformát használtuk, mivel ez, a kötőhely szerkezetét, illetve a kötődési reakciók termodinamikai és kinetikai adatait tekintve megegyezik a DYNLL1 izoformával, viszont nem tartalmazza azt a felszíni, reaktív cisztein oldalláncot, amely lehetővé teszi a DYNLL1 redox regulációban való részvételét (52). Ennek hiányában a DYNLL2 kémiaiilag sokkal stabilabb, jobban ellenáll a hosszú időt igénybe vevő krisztallográfiai kísérletek során fellépő oxidáló hatásoknak.

Ahhoz, hogy megérthessük a -5. pozícióban megjelenő valin jelentőségét a DYNLL-hez történő kötődés stabilizálásában, kristályosítottuk a monomer Ac-SRGTQTE peptid, illetve a leucin-cipzárral dimerizált, (GS)VSRTQTE peptid DYNLL2-vel alkotott komplexét, majd röntgen diffrakcióval határoztuk meg a térszerkezeteket. (A zárójelben szereplő két aminosav klónozási műtermék.) (függelék, 12.2.). Kísérletet tettünk a monomer Ac-VSRGTQTE peptid-DYNLL2 komplex térszerkezetének meghatározására is, ám ez igen különös viselkedést mutatott. A komplex összemérését hasonló koncentráció-arányokkal próbáltuk kezdetben, mint az Ac-SRGTQTE peptid esetén (Lásd: 6.8. fejezet!). Az oldat néhány perc után zavarossá vált, ráeső fényben selymes csillogást mutatott (Precipitáló szerek jelenléte nélkül, fiziológias pufférben!). Fénymikroszkóppal megvizsgálva látható volt, hogy több ezer apró kristálycsoport megjelenése okozta a zavarosodást. Az oldat kb. 8-szoros hígításával ezek feloldódtak. A hígított oldat hűtésével újra megjelentek, visszamelegítés hatására ismét eltűntek. A kristálynövekedés lelassítása céljából több ezer különböző kristályosítási körülményt teszteltünk, de sajnos még a legjobb kristályok (10. ábra) is meglehetősen kicsik maradtak, szinte csak egy irányban növekedtek, és csak $\sim 10\text{\AA}$ -körül szórtak. (A 8.8. fejezet a gyors kristálynövekedés egy lehetséges magyarázatát mutatja be.)

Az Ac-SRGTQTE-DYNLL2 komplex kristályszerkezetét 1.31 \AA felbontás mellett sikerült megoldani (11/A. ábra). Az aszimmetrikus egység négy DYNLL láncot tartalmaz, melyek két dimer alegységei. Ezek kötőárkaiban négy peptid helyezkedik el, melyek az elektronsűrűségi térkép alapján jól azonosíthatóak. Minden aminosav a Ramachandran-diagram legkedvezőbb régióiba eső ϕ és ψ szögekkel jellemezhető, kivéve az 51. aszparagint, amely – mint minden korábban meghatározott DYNLL szerkezet esetén (21-29) – pozitív ϕ értékkel rendelkezik.

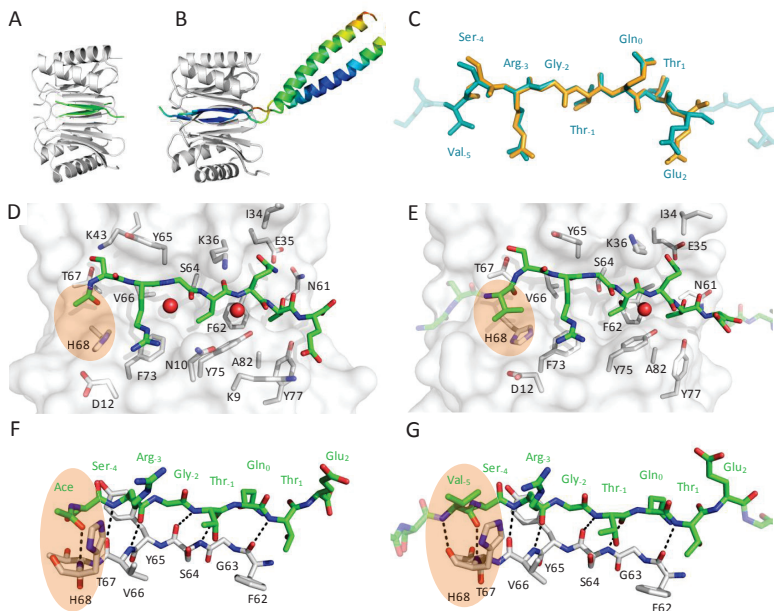


10. ábra: A DYNLL2 fehérje Ac-VSRGTQTE peptiddel (A) és az Ac-SRGTQTE peptiddel (B) alkotott komplexéből nőtt kristályok az optimalizálás után, azonos nagytítás mellett. Előbbi esetben jól látható, hogy a kristályok szinte csak egyirányú növekedést mutattak. Ezek csak kb. 10 Å körül szórtaak, így sajnos nem volt lehetséges a röntgendiffrakcióval történő szerkezet-meghatározás.

Az általunk meghatározott modellben a DYNLL dimer állapotát, a monomerek közötti interakciókat, a kötőárok kialakulását, a másodlagos szerkezeti elemeket és ezek egymáshoz viszonyított térbeli helyzetét tekintve nagyban hasonlít a 4.2. fejezetben bemutatott szerkezetekhez. Mindkét kötőárkban egy-egy Ac-SRGTQTE peptidet találunk (11/D. ábra), melyek a szokott módon, hatodik (antiparallel) szálként egészítik ki az öt szálból álló β -redőket (11/F. ábra). A kötött peptidek meglehetősen hasonló konformációt vesznek fel. A DYNLL kötőárkát képező aminosavakat az 11/D. ábrán szürkével jelöltem. Jól láthatjuk, hogy számos, az árkot határoló aromás aminosav (Phe₇₃, Tyr₇₅, Tyr₇₇, Phe₆₂ és Tyr₆₅) adja annak hidrofób jellegét. A peptid Thr₁ és Thr₁ oldallánca az árok mélye felé fordul, míg a többi kötésben szereplő oldallánc a DYNLL felszínén fekvő több különböző interakciót is kialakít. A peptid és a DYNLL között, az árok mélyén érdekes módon vízmolekulákat találunk, melyek szintén szerepet játszanak a kötődésben (11/D. ábra).

A monomer Ac-VSRGTQTE peptid komplexével tett sikertelen próbálkozások után szerencsére a leucin-cipzárral dimerizált változat DYNLL komplexe megfelelő minőségű kristályokat adott, így ennek szerkezetét 2,9 Å felbontás mellett sikerült meghatározni (11/B. ábra). Mivel a fágbemutató kísérletek bivalens formában történtek, tehát a peptidek a fágok felszínén, azonos módon, leucin-cipzárral dimerizált formában voltak jelen, így ez a szerkezet több okból is releváns információkkal szolgálhat. Amellett, hogy atomi felbontású modell áll a rendelkezésünkre az EML3 fehérje kötőmotívumának DYNLL2-vel alkotott komplexéről, megismerhetjük a Val₅ szerepét a komplex stabilizálásában, valamint igazolhatjuk, hogy az *in vitro* evolúciós kísérletek az

elképzeléseink szerint zajlottak. (Pl.: valóban megtörtént-e a peptid dimerizációja, megfelelő volt-e a linkerhossz és valóban kialakult-e a bivalens kötődés?)



11. ábra: Az Ac-SRGTQTE - DYNLL2 (A),(C),(D),(F) és a leucin-cipzárral dimerizált VSRGTQTE - DYNLL2 komplexek (B),(C),(E),(G) röntgen-kristallográfiával meghatározott térszerkezete. A dimerizált VSRGTQTE peptidiek párhuzamos módon illeszkednek a DYNLL két kötőárkába, ezáltal dimer-dimer interakció, bivalens kölcsönhatás jön létre. A ligandum színezése a hőmérsékleti faktor értékeit szimbolizálja (131: piros, 48: kék). Szembetűnő a linker szekvencia (GGSG) magasabb flexibilitása. (B) A monomer (narancs) és dimer (kék) peptidiek hasonló konformációit vesznek fel a kötőárkakban. (C) A két ligandum és a kötőárkot alkotó aminosavak oldalláncai közötti interakciók. Érdekes módon a monomer peptid esetén a „szokásos” (2. ábrán már bemutatott) kötődésben szerepet játszó vízmolekula mellett egy második, hasonló szerepű vízmolekula is azonosítható (piros gömbök). (D),(E) Jól látható, hogy az árok kialakításában számos aromás aminosav vesz részt. (A (D) és (E) ábrán minden olyan DYNLL oldallancot jelöltem, melynek van olyan atomja, ami a peptid bármely atomjától számított 4 Å távolságon belül helyezkedik el.) Ha az ábrákat a peptidok tengelye körül kb. 90°-kal elforgatjuk, láthatjuk, hogy azok antiparalel β -redőként kötődnek a fehérjéhez. (A hidrogénkötéseket fekete szaggatott vonalak jelölik.) (F),(G) A Val₅ stabilizáló szerepét megérthetjük a (D)-(E) és (F)-(G) ábrákon kiemelt területek összehasonlításával. Látható, hogy a Val₅ oldallánca a DYNLL His₆₈ imidazol gyűrűjével alakít ki interakcióit (E), míg éppen ugyanitt egy új hidrogénkötés is jelenik meg a peptidgerincek között (G).

Ez a szerkezet újabb bizonyíték aviditás-hipotézisünk helyességét illetően is, hiszen a mesterségesen dimerizált Bmf peptid a dimer EML3-tól csak a motívum szekvenciájában különbözik (7.3. fejezet).

A DYNLL2 a dimer, illetve a monomer EML3 peptiddel meghatározott komplexben nagyban hasonlít, amit a két komplex DYNLL molekuláinak egymásra illesztésével meghatározott RMSD értékek is jól mutatnak (a peptidgerinc atomjaira számított RMSD értékek a 0,38–0,66 Å tartományban szóródnak). A monomer és a dimerizált kötőmotívumok is nagy konformációs hasonlóságot mutatnak (11/C. ábra). A peptidgerinc atomjaira számított RMSD értékek ez esetben a 0,42–0,61 Å tartományban szóródnak. Néhány, a motívumtól távolabb eső oldallánc nem látszott az elektronsűrűségi térképen, ami minden bizonnyal mozgékonyaságuk eredménye. Szerencsére a kötőmotívumok környékén az elektronsűrűségi térkép jó minősége – ami valószínűleg a stabilizáló intermolekuláris kölcsönhatásoknak volt köszönhető – lehetővé tette a minden atomra kiterjedő modellépítést. A szerkezetben a DYNLL2 dimer a kötőárkokkal, illetve a motívumokkal együtt szimmetrikus, viszont a leucin-cipzár a kristálykontaktusok aszimmetriája miatt elhajlik a DYNLL által kijelölt szimmetriatengelytől, ami jól mutatja a használt linkerek flexibilitását. Szintén erre utal, hogy a linkerek peptidgerince más konformációt vesz fel, illetve, hogy ezen a szakaszon a környező régiókhoz képest nagyobb a hőmérsékleti faktor értékekkel találkozunk (11/B. ábra). Az itt megfigyelt flexibilitás teszi lehetővé, hogy a dimerizációért felelős leucin-cipzár ne befolyásolja az egyes kötőmotívumok által a DYNLL kötőárkával kialakított interakciós mintázatot. A dimer peptid monomernek megfelelő szakasza (SRGTQTE) a monomerrel megegyező módon, öt hidrogénkötést kialakítva (a hatodik hidrogénkötés az acetyl-csoport karbonil-oxigénjének köszönhető), antiparallel β -redőként kapcsolódik a DYNLL-hez (11/F. ábra). A monomerrel közös tulajdonság további tizenegy, a kötődésben szerepet játszó hidrogénkötés megjelenése is. A klónozási műtermékként a dimerizált peptid N-terminálisán maradt glicin és szerin (a 11/C., 11/E., 11/G. ábrákon halványan látható) a DYNLL-lel nem alakít ki közvetlenül kötések.

Amint azt kalorimetriás mérések igazolják, a Val₅ a komplex stabilitásában játszik fontos szerepet. Ennek hátterében egyrészt az általa kialakított két hidrogénkötés állhat, melyek kiterjesztik a β -redőt (11/G. ábra), másrészt az oldallánca beleilleszkedik egy kisebb mélyedésbe, ahol ráfekszik a DYNLL 68. hisztidinjének imidazol gyűrűjére

(11/E. ábra). Ez a gyűrű a kötődéshez a valin oldalláncsal Van der Waals interakciókon kívül a peptid Arg₃ oldalláncával kialakított hidrogénkötéssel is hozzájárul.

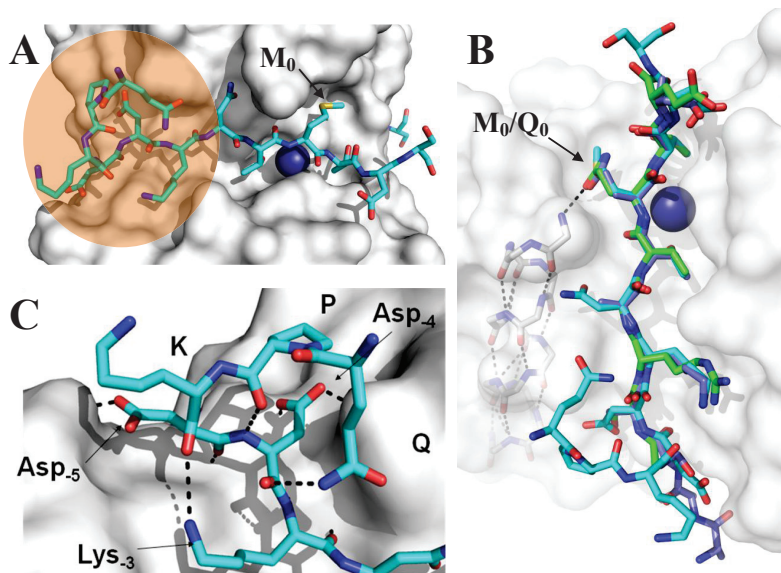
7.7. A miozin Va - DYNLL2 interakció szerkezeti alapjai

Munkánk során sikeresen kristályosítottuk a miozin Va kötőmotívumának megfelelő peptid DYNLL2-vel alkotott komplexét, majd röntgendiffrakcióval határoztuk meg a háromdimenziós szerkezetet, 1,85 Å felbontás mellett. Ahogyan arra korábbi eredményeink (39) alapján is következtetni lehetett, a miozin Va nem-kanonikus kötőmotívuma a DYNLL kötőárkában helyezkedik el (12/A. ábra). A kötőpeptid által felvett konformáció, bár a konzervált glutamin helyett itt metionint találunk, meglehetősen hasonlít a kanonikus motívumok esetén tapasztaltakhoz. Ezt az előző fejezetben leírt EML3 kötőpeptiddel (az eddigi legjobb felbontású DYNLL szerkezet), illetve az irodalomból ismert *Swallow* peptiddel történő illesztés jól szemlélteti (12/B. ábra). A glutamin oldallanc a kanonikus motívumokban hidrogénkötést kialakítva zárja le a DYNLL egyik α -hélixét (12/B. ábra). (A hidrogénkötés a DYNLL peptidgerinc Lys₃₆ amid NH-csoportja és az oldallanc ϵ -oxigénje között jön létre.) Erre a metionin nem képes, azonban a nagyfokú konformációs hasonlóság miatt a DYNLL-lel kialakított egyéb kölcsönhatások itt sem hiányoznak. A miozin Va a kanonikus motívumokhoz viszonyítva kisebb affinitással rendelkezik (2. táblázat), ami valószínűleg éppen az említett hidrogénkötés hiányának köszönhető.

A tény, hogy a miozin Va peptidek párhuzamos módon, a DYNLL kötőárkába illeszkednek, megerősíti korábbi eredményeinket (39), miszerint a DYNLL-nek a teljes hosszúságú, dimer miozin Va molekulák két polipeptidláncát összetartva a farokrégió *coiled-coil* szekvenciáinak stabilizálásában van szerepe, ami a transzport funkciók szabályozásában lehet fontos. Az viszont erősen valószínűtlennek tűnik, hogy kargó-adapter szerepet tölthetne be a DYNLL úgy, hogy egyik kötőárkával a motorhoz, míg másikkal a szállítandó fehérjéhez kapcsolódna.

A három aminosav hosszú B-exonról (DDK) korábban kimutattuk, hogy jelenléte elengedhetetlen a kötődés szempontjából: amíg a B-exon nélküli szekvencia (IQPKNTM₀TDST) esetén nem volt mérhető interakció (39), addig a B-exont is tartalmazó (IQPKDDKNTM₀TDST) peptid esetén a disszociációs állandó $\sim 10 \mu\text{M}$ körüli. A meghatározott szerkezeti modell szerint ez a három aminosav a kötődéshez számos

interakciót kialakítva járul hozzá, melyekben mind a peptidgerinc, mind az oldalláncok részt vesznek (12/C. ábra).



12. ábra: A miozin Va peptid – DYNLL komplex röntgen-diffrakcióval, 1,85 Å felbontás mellett meghatározott szerkezete. A miozin Va kötőmotívumának megfelelő peptid (pálcika-ábrázolás) a többi partnerhez hasonlóan jól illeszkedik a DYNLL kötőárkába. Az interakció ennél a kötőmotívumnál is részben vízmolekulák közvetítésével valósul meg, melyek egyszerre képesek a fehérjével és a peptiddel is hidrogénkötéseket kialakítani. Ezek közül az ábrán csak a „legtipikusabb”, 2. ábrán is bemutatott vízmolekula látható. (A) A miozin Va peptid (világoskék), az előző fejezetben bemutatott EML3 peptid (zöld) és a Swallow peptid (sötétkék) egymásra illesztésével láthatjuk a nagyfokú konformációs hasonlóságot, mely nem csak a kötés szempontjából fontos régió peptidgerincére, de bizonyos oldalláncokra, így a konzervált glutaminra és az azt helyettesítő metioninra is jellemző. A 0. pozícióban álló glutamin oldallánca lezárja a DYNLL egyik α -hélixét (szürke), míg a metionin erre nem képes. (B) A B-exon aminosavai (Lys₃, Asp₄, Asp₅) számos interakciót alakítanak ki a DYNLL-lel. Érdekes módon a B-exontól N-terminális irányban lévő 3 aminosav (QPK) visszahajlik a B-exon irányába. Ezt az állapotot a B-exonnal kialakított 3 hidrogénkötés (fekete szaggatott vonalak), valamint a prolin korlátozott konformációs szabadsága is stabilizálja. (C) Az (A) ábrán kiemelt terület nagyítva és elforgatva látható a (C) ábrán.)

Érdekes módon a B-exon nem csak a DYNLL-lel lép interakcióba, hanem a tőle N-terminális irányban található három aminosavval (QPK) is, melyek visszahajlanak a kötőárok, illetve a B-exon irányába. Ennek az állapotnak a stabilitásához valószínűleg több

hidrogén-híd mellett a prolin korlátozott konformációs szabadsága is hozzájárul (12/C. ábra). Eddig nem publikált NMR méréseink szintén azt mutatják, hogy a szigorúan értelmezett kötőmotívum környezetében (N- és C-terminális irányban) található aminosavak bizonyos mértékig részt vesznek a kötődésben. Azt, hogy valódi másodlagos kötőhelyről, illetve a DYNLL kötés új, eddig még le nem írt módjáról van szó – vagyis a jelenség nem pusztán a miozin fragmentumok rövidegéből adódó műtermék – hosszabb, legalább a környező *coiled-coil* régiókat is tartalmazó fragmentumokkal végzett kísérletek dönthetik el. A termodinamikai és kinetikai méréseinkhez használt dimer miozin Va - DYNLL komplexének kristályosítása folyamatban van, de sajnos megfelelő minőségű kristályokat még nem sikerült létrehozni.

8. Diszkusszió

8.1. A DYNLL izoformák különböző partnerekhez történő kötődése hasonló paraméterekkel jellemezhető.

A DYNLL-nek, mely az eukarióták körében általánosan előforduló csomóponti fehérje, emlősökben két paralógját különböztetjük meg: DYNLL1 és DYNLL2. Ezek szekvenciája 93%-ban megegyezik. Korábban kimutatták, hogy két proapoptotikus fehérje, a Bim és a Bmf, melyek KXTQTX-típusú DYNLL-kötőmotívummal rendelkeznek, *in vivo* szelektíven kötődnek a DYNLL izoformákhoz: a Bim a DYNLL1-hez, míg a Bmf a DYNLL2-höz (10, 11). A szelektív kötődést viszont *in vitro*, GST pull-down kísérletekben nem sikerült kimutatni (22). Egy másik kötőpartner, az nNOS esetén, mely XGI/VQTD-típusú kötőmotívummal rendelkezik, kizárólag a DYNLL1-el történő interakciót írták le (12).

Munkánk során *in vitro*, kvantitatív módon összehasonlítottuk a DYNLL izoformák kötődését két partnerhez, a Bmf-hez illetve az nNOS-hoz, melyek különböző osztályokba sorolható kötőmotívumokkal rendelkeznek (Bmf: KXTQTX, nNOS: XGI/VQVD). **Mind az affinitásokat, mind a kinetikai konstansokat tekintve a DYNLL1 és DYNLL2 nagyon hasonló viselkedést mutatott.** Mivel az általunk megfigyelt minimális különbségek nem magyarázhatják az *in vivo* tapasztalt szelektivitást, fel kell tételeznünk valamilyen egyéb „faktor” létezését a sejtekben, melynek funkciója a szelektív partner-kötés biztosítása. Ez lehet például egy fehérje, mely egyszerre kötődik valamelyik a DYNLL izoformához és bizonyos partnerekhez. Egy ilyen fehérje, ha létezik, nem kötődhet a DYNLL kötőárkához, hiszen akkor versengene a partnerekkel a DYNLL kötésért. Olyan felszínhez sem kötődhet (kizárólagosan), mely mindkét izoforma esetén megegyezik. A DYNLL1 és DYNLL2 mindössze hat aminosavban mutat eltérést, melyek mindegyike a molekula kötőárkóktól távol eső felszínén található. (2/B. ábra) Ez a régió lehet a kötőhelye a jelenleg még nem azonosított, „szelektív kötődést meghatározó faktornak”. Day és munkatársai korábban *in vivo* kimutatták, hogy a DYNLL 41. aminosav oldallánca, mely a DYNLL1 esetén hisztidin, a DYNLL2 estén tirozin, határozza meg azt, hogy a citoszkeleton mely elemeihez kötődik specifikusan a két izoforma (22). Ez az oldallánc tehát a jósolt, specificitás meghatározó fehérje DYNLL-hez kötődésében

bizonyosan kulcsfontosságú szerepet játszik, azonban ennek bizonyításához, illetve a fehérje azonosításához további kísérletek szükségesek.

8.2. A kötődés erősségének finomhangolása a partner szekvenciák változatosságán keresztül valósul meg

A DYNLL-hez kötődő lineáris motívumokat eredetileg – szekvenciájuk alapján – két osztályba sorolták: $X_3G_2I/V_{-1}Q_0V_1D_2$ (pl. nNOS) és $K_3X_2T_{-1}Q_0T_1X_2$ (pl. Bmf) (43, 179). A mindkét osztály konszenzus szekvenciájában előforduló glutamin a legkonzerváltabb pozíció, melyet előbbi esetben általában izoleucin vagy valin, míg utóbbi esetben általában treonin oldalláncok határolnak (22, 180). Fontos megjegyeznünk, hogy „kevert” szekvenciával rendelkező partnereket is azonosítottak már. Ilyen például a p53BP1 ($L_1Q_0T_1$) (181), illetve a Nup159 ($V_{-1}Q_0T_1$) (17). Ráadásul léteznek olyan kísérletesen igazolt kötőmotívumok is, melyekből hiányzik az említett központi, konzervált glutamin. Ebben a munkában két ilyen nem-kanonikus motívumot tartalmazó fehérjét vizsgáltunk: myoVa és Pak1. A myoVa kötőmotívumában a glutamin helyett metionint találunk ($K_3N_2T_{-1}M_0T_1D_2$) (39), de egyébként inkább a $K_3X_2T_{-1}Q_0T_1X_2$ -családdal mutat hasonlóságot. Azt, hogy ez a motívum a többi partnerhez hasonlóan a DYNLL kötőárákba illeszkedik, röntgen-krisztallográfiai eredményeink bizonyítják. A Pak1 ($V_{-3}A_{-2}T_{-1}S_0P_1I_2$) (24) egyértelműen a nem-kanonikus csoportba tartozik.

Meghatároztuk a DYNLL2 kötődésének erősségét jellemző disszociációs konstansokat négy partner esetén, melyek közül az nNOS és a Bmf a két kanonikus szekvenciaosztály tipikus képviselője, míg a myoVa és a Pak1 nem-kanonikus partnerek. **A szekvenciákban megfigyelhető nagyszámú különbség ellenére aránylag kis eltéréseket tapasztaltunk a disszociációs állandók értékeiben** (2. táblázat). Amennyiben *in vivo* versengés alakulna ki a különböző partnerek között a DYNLL kötődésért, ezek az affinitás különbségek önmagukban valószínűleg nem kellően nagyok ahhoz, hogy a kötődés nagyrészt csak bizonyos partnerekre korlátozódjon. Egy korábbi tanulmány már megpróbált egyfajta hierarchiát felállítani a kötőmotívumok között az affinitások alapján (24). Ezt a mi összehasonlító elemzésünk nagyrészt megerősíti, azzal a kivétellel, hogy a myoVa ötször erősebb kötődést mutat, mint a Pak1. Elmondhatjuk viszont, hogy a különböző partnerek kötési erőssége egy aránylag szűk tartományban szóródik, melyen belül a motívumok szekvenciáinak változatosságával párhuzamosan az affinitások is apró lépésekben, szinte folytonos skálán változhatnak. **Az egyes szekvencia-osztályokhoz való**

tartozás – amennyiben egyáltalán egyértelműen megállapítható – önmagában nem jelent nagy affinitásbeli különbségeket.

Ennél színesebb kép tárul elénk, ha a különböző partnerek kötődését nem csak a disszociációs állandók segítségével próbáljuk összehasonlítani. A **termodinamikai és kinetikai konstansok értékei arra engednek következtetni, hogy a partnerek kötődési mechanizmusa, a DYNLL és partnerei között létrejövő interakciós mintázat az egyes esetekben eltérő.** Az általunk vizsgált $K_3X_2T_{-1}Q_0T_1X_2$ -osztályba tartozó Bmf esetén a kötődés entalpiikusan kedvezőnek, míg entropikusan kedvezőtlennek bizonyult (2. táblázat). Az $X_3G_2I/V_{-1}Q_0V_1D_2$ -osztályba tartozó nNOS, illetve a két nem-kanonikus szekvencia (a myoVa és Pak1) esetén a kötődés egyaránt entalpia és entrópia vezérelt (2. táblázat). Továbbá a Bmf esetén a disszociációs sebességi állandó is jóval kisebb, mint a többi partnernél. Egyelőre sajnos az még nem egyértelmű, hogy az eltérő kötődési mechanizmusoknak, illetve interakciós mintázatoknak van-e bármilyen biológiai jelentősége.

Benison és munkatársai szerint a DYNLL esetén megfigyelt gyenge pozitív kooperativitás olyan mechanizmus lehet, mely elősegíti, hogy a fehérje egyidejűleg mindkét kötőárkával ugyanolyan motívumot tartalmazó partnerekhez kötődjön (25). Habár kinetikai és termodinamikai méréseink nem mutatták jelét kooperativitásnak, mégis lehetséges, hogy ez is befolyásolja az optimális kötőerősséget és specifitást. Viszont eredményeink – összhangban Williams és munkatársainak korábbi, kvalitatív megállapításaival (24, 28) – egyértelműen arra mutatnak, hogy e tekintetben a partnerek dimer állapotja, illetve az ennek kapcsán fellépő aviditás (8.3. fejezet) a döntő. A kötőmotívumok közötti eltéréseket éppen e miatt – jelenlegi tudásunk szerint – inkább a DYNLL interakciós hálózatának finomhangolásaként értelmezhetjük.

8.3. Az aviditás fontossága: több százszor erősebb kötődés a DYNLL és partnerei között

Ahhoz, hogy a DYNLL és partnerei közötti kölcsönhatást megérthessük, több olyan tényezőt is figyelembe kell vennünk, melyek részletes tárgyalásával dolgozatom eddigi részében adós maradtam. Első példaként említhetjük a DYNLL monomer-dimer egyensúlyát, vagyis a DYNLL dimerek stabilitását. Ez az egyensúly szorosan kapcsolódik a partnerkötési egyensúlyokhoz. Hogyan volt lehetséges mérési adataink elemzése ennek a jelenségnek a kötődési modellekbe történő beépítése nélkül? A DYNLL dimerek stabilitása

igen nagy, a dimer-monomer átmenetre vonatkozó disszociációs állandó nanomólós tartományba esik ($\sim 160\text{nM}$) (24), ami azt jelenti, hogy kísérleteink során a DYNLL izoformákat gyakorlatilag 100%-ban dimernek tekinthetjük. Valószínűleg ugyanezt mondhatjuk el *in vivo* is, hiszen mindkét izoforma, de főleg a DYNLL1, meglehetősen nagy kópiaszámban van jelen a sejtekben (182). Mivel a monomer állapot egyet jelent a kötőárkok megszűnésével, a monomer-dimer egyensúly eltolódása lehetőséget ad egy hatékony szabályozásra, például reverzibilis foszforiláció (8.4. fejezet) által.

Egy másik fontos tényező a már említett, kötőárkok közötti kooperativitás. Ennek jelét kinetikai és termodinamikai adataink nem mutatták, így beépítése egyetlen általunk használt modellbe sem volt szükséges. Adataink elemzésénél tehát azzal az egyszerűsítéssel éltünk, hogy a DYNLL két, egymással szemközt kötőárka szerkezetileg és funkcionálisan megegyező, valamint egymástól független (független, 12.1.).

A harmadik tényező a komplexek sztöchiometriája. A dimer miozin Va fragmentum esetén 1:1, vagyis dimer:dimer myoVa-DLC komplexek képződését tapasztaltuk. Más kutatócsoportok hasonló sztöchiometriát írtak le például csirkeagyból izolált miozin Va esetén (8), illetve a két ismert Tctex-DIC-DYNLL kristályszerkezetben is ezt figyelhetjük meg (28, 29).

Az aviditás nem jelent mást, minthogy a dimer állapot, vagyis a bivalencia a látszólagos affinitást megnöveli. Általánosságban a multivalencia következtében fellépő, az egyedi kölcsönhatások összegzett, szinergikus hatásáról van szó (183). A jelenség főként az antitestek, illetve az immunológia körében ismert, míg más fehérje-fehérje interakciók körében már jóval kevésbé tanulmányozott (183, 184). A DYNLL és egy dimer dinein intermedier lánc fragmentum esetén korábban már megfigyelték, de csak kvalitatív leírása történt meg (28). **Munkánk során egy természetes (myoVa) és egy mesterségesen előállított dimer partner (Bmf) látszólagos affinitás értékeit határoztuk meg, illetve hasonlítottuk össze a megfelelő monomer peptidekre vonatkozó értékekkel. Mindkét esetben több mint kétszázszoros affinitásnövekedést tapasztaltunk. A miozin Va esetén a stopped-flow és SPR módszerekkel meghatározott kinetikai adatok egyértelműen mutatják, hogy a látszólagos affinitás növekedése mögött a disszociációs sebességi állandó (k_{off}) csökkenése áll. Ez tökéletes összhangban van aviditás hipotézisünkkel (184). (A Bmf esetén a disszociáció túl lassú, ezért már a monomer forma k_{off} értékét is csak nehezen, pontatlanul tudtuk meghatározni.) Velünk egyidőben hasonló eredményre jutottak Hall és munkatársai, akik megfigyelték, hogy a**

dinein intermedier lánchoz egymás közelében, hasonló módon kötődő DYNLL és Tctex könnyűláncok egyikének előzetes kötődése megnöveli a másik látszólagos affinitását az intermedier lánchoz, mivel dimerizálja azt (29). Mint már a bevezetőben is említettem, a szakirodalomban publikált, DYNLL-partner interakciókra vonatkozó disszociációs állandók igen széles skálán (100 nM - 100 μ M) mozognak (24, 39, 45-49). Az aviditás erre is magyarázatot szolgáltat, hiszen egyes interakciókat monomer, míg másokat dimer fehérje-fragmentumokkal határoztak meg.

Végül fontos megjegyeznünk, hogy az általunk meghatározott monomer- és mesterségesen dimerizált EML3-DYNLL komplex szerkezetek, továbbá az itt is kimért affinitás adatok egyértelműen bizonyítják, hogy **a Leucin-cipzárral végzett mesterséges kötőpartner-dimerizáció megfelelő stratégia a bivalencia, illetve az aviditás előidézésére és modellezésére a DYNLL és kötőpartnerei esetén.**

8.4. A DYNLL szabályozásának egy lehetséges módja: dimerek foszforilációt követő disszociációja

A DYNLL foszforilációs szabályozásának legvitatottabb pontja maga a protein-kináz, mely a foszforilációt végzi *in vivo*. Korábban leírták, hogy a DYNLL1 kötődik Pak1 kinázhoz, valamint, hogy egyben szubsztrátja is a kináznak (14, 51). Később a Pak1 regulációban betöltött szerepét kétségbe vonták (24). Saját eredményeink szerint a Pak1 kináz *in vitro* sem a DYNLL1-et sem a DYNLL2-t nem foszforilálja, viszont a rekombinánsan előállított fehérjék affinitás kromatográfiás tisztításához használt His-tag utáni trombin felismerőhelyet igen, amennyiben az nincs proteolitikusan eltávolítva a fehérjéről (függelék, 12.6.). Mindent összevetve arra következtethetünk, hogy **a Pak1 közvetlenül nem érintett a DYNLL interakciós hálózatának szabályozásában, valamint, hogy a 88. szerin oldalláncot egy még nem azonosított protein-kináz foszforilálja a sejtekben.**

A DYNLL2 monomer formában – kötőárkok hiányában – képtelen a partnereit megkötni. Barbar és munkatársai NMR titrálások kísérletek segítségével határozták meg a foszforilációt utánzó S88E mutáns disszociációs állandóját, ami 1 mM felettinek bizonyult (185). Ez esetben tehát a monomer-dimer egyensúly jelentősen a monomerek irányába tolódik. Egyes kísérletekben *in vitro* nem sikerült interakciót kimutatni (vagy csak nagyon gyengét) az S88E mutáns és a Bim között (46). Mások a DIC és a *Swallow* esetén aránylag erős kötődését tapasztaltak (49). Az S88E mutáns partnerkötési képességét bizonyítja,

hogy a *Drosophila* DYNLL S88E mutánsának a *Swallow* fehérje kötőpeptidjével alkotott komplexét sikerült kristályosítani, majd atomi felbontású szerkezetét meghatározni (185). A mutáns ebben a komplexben dimereket alkot, melyek szemközti kötőárkaiba egy-egy peptid illeszkedik. A szerkezete rendkívül hasonló a vad típusú DYNLL-swallow komplexhez (27, 185).

Munkánk során mi is azt tapasztaltuk, hogy akár egy monomer partner kötődése a kísérleti körülmények között kis mennyiségben jelen lévő dimer S88E-hez is képes a Le Chatelier-Braun-elv szerint a mutáns monomer-dimer egyensúlyát a dimer képződés irányába tolni. Igaz, a (partner kötődésére vonatkozó) látszólagos disszociációs állandó értéke meglehetősen magas ($K_d \sim 110 \mu\text{M}$) volt. Egy dimer partner, a miozin Va már ~ 50 -szer nagyobb affinitást ($2,7 \mu\text{M}$) mutatott, tehát az aviditás az S88E mutáns esetén is megjelenik. Érdekes, hogy itt már a látszólagos disszociációs állandó abba a nagyságrendbe esik, ahová a vad típusú DYNLL monomer partnerekkel történő interakcióira vonatkozó értékek. Ez arra utalhat, hogy a DYNLL 88. szerin oldalláncán történő foszforiláció nem minden esetben eredményezi a kötődés teljes gátlását, illetve ezáltal a biológiai funkció kiesését *in vivo*. Alátámasztja ezt egy nemrég megjelent tanulmány is, melyben a *Chlamydomonas* flagellumában előforduló DYNLL homológ foszforilációt utánzó S90E mutánsát, mely megfelel az általunk használt humán DYNLL2 S88E mutációnak, *in vitro* nagyrészt monomernek, viszont *in vivo* (partner kötött) dimernek találták. A mutáció nem okozott szignifikáns változást a flagellumok kialakulásában, illetve mozgásában (186).

Összegzésül elmondhatjuk, hogy a **DYNLL monomer-dimer egyensúlyának befolyásolása a 88. szerin oldallánc foszforilációján keresztül hatékony szabályozás lehet, hiszen a megfelelően nagy lokális koncentrációval rendelkező dimer partnerek esetén a látszólagos affinitás csökkenésének ellenére, fiziológiás körülmények között fennmarad a kötődés, míg monomer partnereknél ez erősen valószínűtlen.**

8.5. A fehérjepartnerek kötődése a DYNLL-hez két lépésben történik

Munkánk során analizáltuk különböző ligandumok DYNLL-hez történő kötődésének kinetikáját. Minden esetben kétfázisú kötődést láttunk, függetlenül attól, hogy mono-, vagy bivalens volt-e a vizsgált ligandum. A két legegyszerűbb modell, mely képes leírni a rendszer viselkedését az indukált illeszkedés (IF) és a konformációs szelekció (CS).

Mint azt már a bevezetőben említettem, az apo-DYNLL (23-25), illetve különböző partnerekkel alkotott DYNLL komplexek (24, 26-29) röntgen-kristallográfiával meghatározott szerkezete ismert. Ezen szerkezeteket összehasonlítva láthatjuk, hogy a DYNLL kötőárkai a különböző ligandumok hatására eltérő mértékben nyílnak ki: a KXTQTX-típusú *Swallow* esetén ez ~ 1 Å-nek, míg az nNOS esetén ~ 2 Å-nek megfelelő szélesedést jelent (25). A DYNLL konformációs változása tehát együtt jár a partner kötődésével. A kristályszerkezetek azonban semmit nem árulnak el a két folyamat sorrendjéről.

Az DYNLL peptidgerincének dinamikáját ^{15}N NMR relaxációs kísérletekben vizsgálták, apo-, illetve különböző peptidokkal alkotott komplex formában is (187, 188). A kötőárkok környéke az apo-forma esetén különböző, a milliszekundum és mikroszekundum közötti időskálán zajló konformációs változásokat mutatott. A peptidgerinc amid csoportjainak H-D (hidrogén-deutérium) kicserélődésén alapuló NMR mérések a kérdéses régióban perces-órás időskálán zajló konformációs változásokat jeleztek (27, 187, 188). A szerzők ezeket a mozgásokat, alternatív konformációkat tették felelőssé azért, hogy a DYNLL különböző partnerekhez képes kötődni. A DYNLL-peptid komplexeken végzett hasonló vizsgálatok szerint a kötőárkok konformációs „lélegzése” jelentősen csökken, miközben a DYNLL többi része az apo-formához hasonló dinamikát mutat. A komplexképződés után néhány régió flexibilitása továbbra is megmarad (27, 187).

Újabb eredmények szerint a partner kötődésekor bekövetkező szerkezeti rendeződés mértéke függ a partner szekvenciájától, és a kötődési reakció entrópiaváltozásával szorosan korrelál (45). Entropikusan kedvező kötődés esetén a DYNLL peptidgerincének dinamikájában csak minimális változást tapasztaltak. Entropikusan kedvezőtlen kötődés viszont a DYNLL nagyobb rendeződésével járt együtt (45). Ezek az eredmények szintén arra utalnak, hogy a különböző osztályokba tartozó partnerek kötődési mechanizmusa eltérő.

Az itt felsorolt NMR kísérletek tehát megmutatták, hogy az apo-DYNLL-re jellemző a dinamikus átalakulás, az állandó átmenet többféle konformációs állapot között. A komplexek esetén ez sokkal kevésbé kifejezett. Az általunk használt két modell közül a konformációs szelekció (CS) az apo-DYNLL dinamikus egyensúlyát feltételezi egy partnerkötésre képes, illetve erre képtelen állapot között. Ez igen jól egybevágh az itt felsorolt eredményekkel, ezért a DYNLL partner kötési reakcióinak leírására ezt tartjuk a

legalkalmasabb modellnek. Ráadásul gyorskinetikai adatainkra általában ez a modell a χ^2/DoF (*Degrees of Freedom*, szabadsági fokok száma) értékek alapján némileg jobban illeszkedett, sőt a *Fitspace Explorer*-rel meghatározott, 3 dimenziós „konfidencia térképek” szintén jobb illeszkedést jeleztek. (függelék, 12.7.) **Feltételezzük tehát, hogy a DYNLL partner kötése nagyrészt a CS modellnek megfelelően történik.** A CS modell szerinti mechanizmus nem ismeretlen a molekuláris biológiában; legkorábbi leírása 1964-ből, Straub Brunótól származik (189, 190). Létezését kísérletesen bizonyították például az ubikvitin esetében (191). Fontos azonban kihangsúlyoznunk, hogy a CS modell pusztán egyszerűsítés, a valóság ennél összetettebb: ahogy az ubikvitin esetén is (191), így az általunk vizsgált rendszerben is az IF és CS mechanizmusok kombinációjáról van szó (a fenti NMR eredmények szerint a komplexek bizonyos régiói flexibilisek maradnak (27, 45, 187, 188)), illetve a képet tovább bonyolítja a már említett gyenge kooperativitás (25).

8.6. Aviditás, komplex stabilitás és funkció a DYNLL interakciós hálózatában

Aviditás fellépésekor a kötődés erőssége és a specificitása jelentősen növekszik. Milyen fiziológiás szerepe lehet ennek a jelenségnek a DYNLL interakciós hálózatában? Sejten belüli fehérjekoncentráció-viszonyokat feltételezve (ált. mikromólos, ill. nanomólos koncentráció körül) (192), eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy csak a dimer partnerek DYNLL kötőhelyei lehetnek közel teljesen szaturáltak *in vivo*. Ezzel teljesen összhangban van az, hogy az ismert partnerek nagy része eleve stabil dimer, illetve, hogy a DYNLL elősegíti a dimerizációt az által, hogy a két polipeptidláncot fizikailag egymás közelében tartja (147). **A bivalencia következtében kialakuló affinitás-növekedést a DYNLL és a myoVa interakciója esetén egy korábbi munkában kutatócsoportunk írta le először (39). Később a jelenséget mások aviditással magyarázták (28), ami viszont igen nehezen összeegyeztethető azzal a korábbi hipotézissel, miszerint a DYNLL kargó-adapter funkciót tölthet be a dinein és miozin Va motorfehérje komplexek részeként (10, 11, 31-35) Röntgen-krisztallográfiai eredményeink szintén ellentmondanak a kargó-adapter hipotézisnek,** hiszen a miozin Va lineáris kötőmotívuma a kanonikus motívumokhoz hasonlóan a DYNLL kötőárákában helyezkedik el, vagyis a motor verseng a kargóval a DYNLL kötésért.

Nemrég egy mesterségesen készített, sejten belül dimerizálható „kötőpeptid-csapda” használatával Varma és munkatársai kimutatták, hogy a DYNLL

szerepet játszik a dinein-függő vezikuláris sejtorganelum szállításban (193). Érdekes módon a csapda általi szekvesztrálás a mitózisra – mely szintén dinein-függő folyamat – nem volt hatással. A sejtek működésében nem volt észlelhető változás, amíg a csapda monomer formában volt (193). Mindez jól mutatja a bivalencia, illetve az aviditás jelentőségét a DYNLL fehérje-interakciós hálózatában.

A DYNLL kötőpartnerei között mindössze kettő monomert ismerünk, a Bim-et és a Bmf-et (194). E két partner fehérje viszont erősen hidrofób C-terminális régióval rendelkezik, ami esetleg membrán-horgonyként funkcionálhat (171). A membrán felszínéhez való kötöttség „kvázi bivalens” állapotot idézne elő, vagyis bizonyos mértékben itt is aviditás jelentkezne. Érdekes egybeesés, hogy épp a Bmf $K_3X_2T_1Q_0T_1X_2$ -típusú kötőmotívuma mutatott meglepően kicsi disszociációs sebességi állandót ($k_{\text{off}}^C \sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) a többi vizsgált partnerhez képest ($k_{\text{off}}^C \sim 10^{-1} \text{ s}^{-1}$). Általában a dimer partnerek interakcióit vizsgálva tapasztaltuk, hogy a látszólagos k_{off}^C érték kicsi. Ezeknél a partnereknél **aviditásról beszélhetünk, ami, ha reakciósebességekben gondolkodunk, azt jelenti, hogy a kialakuló komplexek életideje hosszú. Ez a sejtben is igaz, ahol a stabilitás ezen formája elengedhetetlen követelmény lehet a funkció betöltéséhez.** Mi állhat a Bmf-DYNLL komplex lassú disszociációjának hátterében? Elképzelhető, hogy a Bmf kötőmotívumának szekvenciája az evolúció során rá ható, a monomer állapotból fakadó szelekciós nyomás miatt rendelkezik alacsonyabb k_{off}^C értékkel. Ez a kinetikai tulajdonság tehát fontos lehet a Bmf-nél, viszont arról sajnos nincs információnk, hogy a $K_3X_2T_1Q_0T_1X_2$ motívum család más tagjaira is jellemző-e, avagy ezek k_{off}^C értéke a „normális” tartományba esik.

Összegzésképpen elmondhatjuk, hogy **a bivalens partnerekre jellemző lassú disszociáció, vagyis a létrejövő dimer partner – DYNLL komplexek hosszú életideje ideális lehet ahhoz, hogy a DYNLL dimerizációs csomóponti fehérjeként szupramolekuláris komplexek felépítésében vegyen részt és szekvesztrációs feladatokat lásson el.**

8.7. Az EML3 szokatlanul erős DYNLL kötésének szerkezeti vonatkozásai és az aviditás

A bevezetőben leírt *in vitro* evolúciós kísérletek, melyek az EML3 potenciális DYNLL-kötőpartnerként való azonosításához vezettek, rámutattak, hogy **a motívum -5. pozíciójában a kötés erőssége szempontjából igen nagy potenciál rejlik.** Érdekes

módon ezt a természet csak ritkán használja ki, hiszen az ismert természetes motívumok szekvenciáit összevetve ebben a pozícióban nem látunk konzerváltságot (4/A. ábra). Termodinamikai mérések bizonyították, hogy a -5-ös pozícióban elhelyezett valin, mely a leggyakoribb itt megjelenő aminosav volt az *in vitro* evolúció során, jelentősen növeli a kötési erősséget. Az általunk végzett szerkezeti munka megmutatta, hogy az affinitásnövekedés két okra vezethető vissza: egyrészt a Val₅ amid csoportja hidrogénkötést alakít ki a DYNLL peptidgerincével, meghosszabbítva ezzel a motívum kötött állapotára jellemző β -redő szerkezetet, másrészt a valin oldallánca a DYNLL His₆₈ oldallánccal alakít ki stabilizáló interakciókat. Megállapításaink jó összhangban vannak Lajoix és munkatársainak korábbi eredményeivel, akik „pepscan” analízisek segítségével kimutatták, hogy a -5. pozícióban a valin, vagy az izoleucin növeli a kötési erősséget (180).

Mi lehet az oka annak, hogy a természet általában nem használja ki a -5. pozícióban rejlő lehetőségeket? Elképzelhető, hogy funkcionális szempontból szükséges lehet az interakciók stabilitása mellett bizonyos fokú átmeneti, dinamikus jelleg is, mely alól néhány partner kivételt jelenthet. Ilyen például az EML3, melynek kötőmotívuma éppen a konszenzus szekvenciával egyezik meg. Alternatív, egyben valószínűbb magyarázat lehet a DYNLL partnerek körében általános bivalencia és az ennek következtében fellépő aviditás. Elképzelhető, hogy a kötőmotívum dimerizáció általi „megduplázása” eleve olyan mértékű növekedést jelent a komplexek stabilitásában, hogy az egyedi motívumokra ható szelekciós nyomás lecsökken. Ez hosszú távon gyengébben kötődő szekvencia variánsok megjelenéséhez vezethet, melyek viszont bivalens formában még mindig kellően erős kölcsönhatásra képesek.

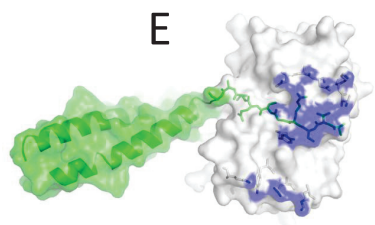
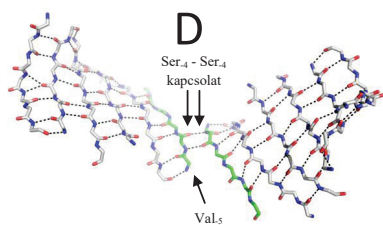
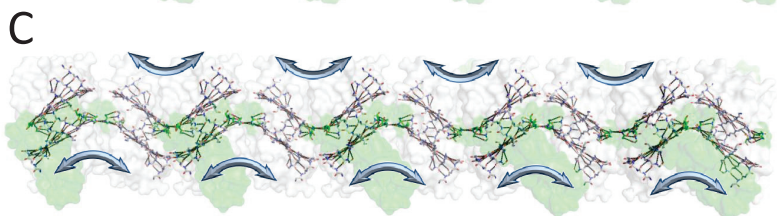
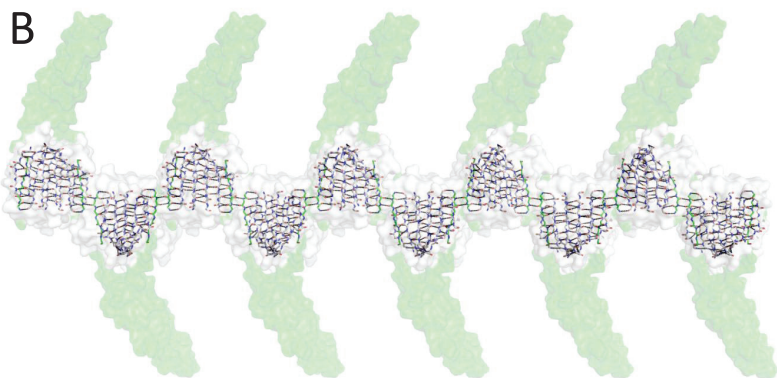
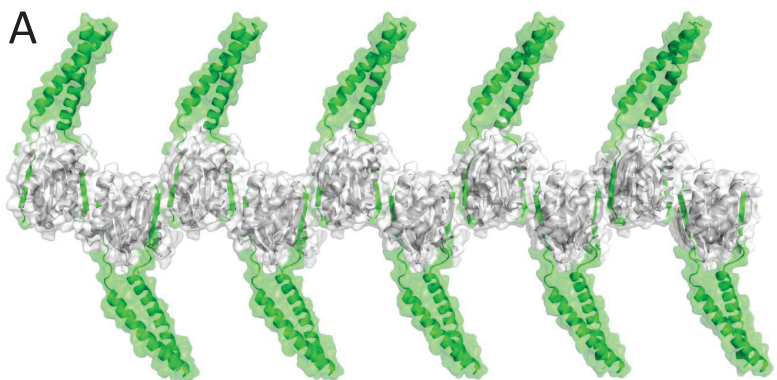
Predikciók alapján elmondhatjuk, hogy – mint sok más partner esetén is – az EML3-ban a kötőmotívum egy *coiled-coil* szekvencia közelében, rendezetlen régióban található. Ez szintén arra utal, hogy az EML3 *in vivo* is a DYNLL kötőpartnere lehet. Ha ez igaz, akkor itt szokatlanul nagy kötési erősséget, vagyis stabilabb komplexeket várhatunk, ahogy ezt egy nagy EML3 fragmens esetén *in vitro* is igazoltuk (4.6.2. fejezet).

8.8. Kargó-adapter hipotézis új megvilágításban

A dimer EML3 peptid által kialakított komplex kristálykontaktusait szemlélve érdekes dolgot figyelhetünk meg: a szomszédos (GS)VSRGTQTE-DYNLL2 komplexek egymással is rövid, antiparallel β -redőket képezve illeszkednek. (13/A-D. ábra) Ennek a kapcsolatnak a kialakulását az teszi lehetővé, hogy a kötődő peptidek két

oldalról kiterjesztik a DYNLL magját képező, egymással szemközti, 5 százból álló β -lemez párt egy-egy hatodik, antiparallel szállal. A komplex felszínén emiatt a β -lemez éle szabadon marad. Belátható, hogy két ilyen szabad β -lemez könnyen egymáshoz tud kapcsolódni, hiszen közöttük számos hidrogénkötés alakulhat ki. Jelen esetben az egymás mellé kerülő peptideken belül a két Ser₄-nek az amid-nitrogénje és karbonil-oxigénje között jön létre két hidrogénkötés (13/D. ábra). Ezáltal a β -redős struktúra a kristályban (szinte) végtelenné válik, hosszú, lineáris „rudakat” hozva létre (13/A-C. ábra). Ha egy ilyen rúdra a DYNLL szimmetriatengelye felől nézünk (13/C. ábra), láthatjuk, hogy valójában nincs szó egyetlen, végtelenített β -redős struktúráról. Két kötőpeptid teremtet kapcsolatot két, egymás melletti DYNLL-dimer között úgy, hogy mindkettő csatlakozik a dimerek magját képező β -lemez pár egyikéhez, miáltal egy hosszú, ívesen hajlott β -lemez képződik (13/D. ábra). A polimer magját megkaphatjuk egy ilyen lemez sorozatos, 180°-os elforgatásával és eltolásával. A rudakat felépítő komplexek közötti interakciós felszín meglehetősen kiterjedt (13/E. ábra). A kötőmotívumok közötti két hidrogénhídon kívül több más interakció is segít stabilizálni a kapcsolatot.

A fehérjék felszínén megjelenő szabad β -lemez élek meglehetősen ritkák; az evolúció különböző megoldásokat alkalmaz ezek elkerülésére (195). Ahol mégis megjelennek, ott általában éppen az a funkciójuk, hogy a fehérjék dimerizációját vagy oligomerizációját biztosítsák (196). Mesterségesen, egyszerű kémiai modell rendszerekben létrehozva őket szintén képesek dimerizációs motívumként viselkedni, illetve a szabadon maradó élek blokkolásán keresztül elkerülhető a kontrollálatlan polimer képződés (197-199). Élő rendszerekben a kontrollálatlan fehérje-aggregációt számos súlyos betegség okaként tartjuk nyilván (200, 201), melyek közös jellemzője valamilyen fehérje-folding probléma, amely kezdetben oligomerizációhoz, majd később fibrilláris, általában kereszt β -lemezes szerkezetű fehérje lerakódások megjelenéséhez vezet a szövetekben (202-204). Ilyen fehérje-aggregációs probléma tehető felelőssé például az Alzheimer-kór kialakulásáért is, mely esetben az úgynevezett β -amiloid peptid aggregációjáról van szó (205). A kialakuló amiloid-fibrillumok atomi felbontású modelljét többféle kísérleti módszer kombinálásával sikerült meghatározni (206) (14/A. ábra).



13. ábra: Kristálykontaktusok a dimer EML3 – DYNLL komplex kristályban. Az felszíni ábrákon és szalagmodelleken a DYNLL szürke, a dimer (GS)VSRGTQTE-motívum (EML3-motívum) zöld. A pálcikaábrákon az oxigénatomokat piros, a nitrogéneket kék, míg a szénatomokat a DYNLL esetén szürke, a kötőpeptidek esetén zöld színnel jelöltem. A hidrogénkötéseket fekete szaggatott vonalak szimbolizálják. A kristályrácsból kiemelt hosszú, lineáris „rudakat” a DYNLL-partner komplexek polimereiként értelmezhetjük. Az egyes komplexek közötti kapcsolatot az EML3-kötőmotívum szekvenciák közötti antiparallel β -redők teremtik meg. (A) Amennyiben a molekulafelszín alatt csak a β -redőt képező peptidgerinc-atomokat ábrázoljuk, láthatjuk, hogy a DYNLL dimerek vázát alkotó β -lemez párok között mindig két peptid teremt kapcsolatot. A peptidek között két hidrogénkötés alakul ki. (B) A polimer rudat saját tengelye mentén 90° -kal elforgatva („felülnézet”), láthatóvá válik, hogy valójában nem jön létre végtelen hosszú β -lemez. A polimer magját elhelyett erősen hajlott β -lemezek sorozata alkotja (kék nyilakkal jelölve), melyek felépítésében két kötőpeptid, valamint az egymás melletti DYNLL dimerekből származó egy-egy, öt láncból álló β -lemez vesz részt. Ezek 90° -os elforgatásaival és eltolásaival felépíthető a polimer gerince. (C) A „C” ábrán nyilakkal jelölt, hajlott β -lemezek nagyított képe. (Itt is csak a peptidgerincek atomjait láthatjuk.) (D) A komplexek egymáshoz illeszkedését a peptidek közötti két hidrogénkötésen kívül több interakció is stabilizálja. A kötőfelszín (kék) kialakításában számos aminosav részt vesz: a kötőmotívum (S. ϕ)V $_3$ S $_4$ R $_3$ G $_2$ szakaszának egyes atomjai, valamint a DYNLL Asn $_{10}$, Ala $_{11}$, Asp $_{12}$, Lys $_{31}$, Tyr $_{41}$, Glu $_{45}$, Lys $_{48}$, Tyr $_{65}$, Thr $_{70}$, Lys $_{71}$ aminosavainak egyes atomjai. (E)

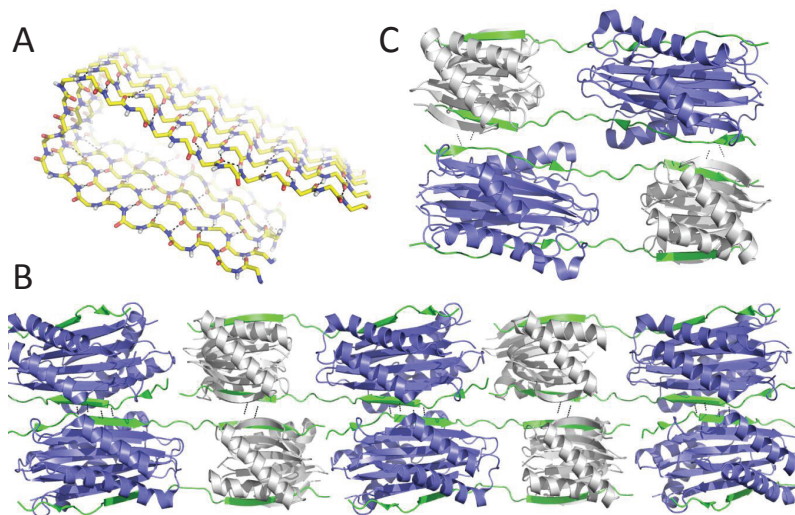
Talán a szabad β -lemez élek megjelenése a magyarázat a monomer VSRGTQTE-DYNLL2 komplex nagy koncentráció mellett megfigyelt, meglepően gyors kristályosodására is (7.6. fejezet). Amennyiben ez igaz, a dimer peptid esetén a gyors kristályosodást, vagyis a hosszú, lineáris polimer „rudak” egymással történő asszociációját éppen a dimerizációért felelős leucin-cipzárok akadályozták meg.

A DYNLL-dimer-EML3 komplex esetén a kristályban megfigyelt hosszú, lineáris polimerek annyiban hasonlítanak tehát az amiloid-fibrillumokra, hogy az összetartó erőt itt is β -redő kapcsolatok jelentik, valamint, hogy a polimer elvileg végtelen hosszú lehet. Létezik egy másik dinein könnyű lánc, a Tctex (T-complex testis-expressed), mely szekvenciáját tekintve jelentősen eltér a DYNLL-től, mégis szerkezeti homológiát mutat vele (207), továbbá kötőpartnereivel is hasonló módon (β -redő, hidrofób kötőárok) lép interakcióba (28, 29). A dinein komplexen belül az intermedier lánc (DIC) kötődik, közvetlenül a DYNLL mellé. Ennek a hármas komplexnek az atomi felbontású szerkezetét két független kutatócsoport is meghatározta (28, 29) (14/B-C. ábra). Érdekes módon mindkét szerkezetre jellemzőek a DYNLL-EML3 komplex esetén tapasztalhatóan hasonlóan kialakuló, β -redő-közvetített kristálykontaktusok, melyekhez szükséges a ligandum jelenléte. További érdekesség, hogy a Tctex röntgen-krisztallográfiával meghatározott szerkezetét (15/A. ábra, pdb: 1YGT) tanulmányozva láthatjuk, hogy az egyes dimerek

N-terminálisai a kristályban a szomszédos dimerek hidrofób kötőárkaiba illeszkednek antiparallel β -redőként éppen úgy, ahogyan azt a partnerek kötőmotívumai tennék (207). Ezáltal egy végtelen, három dimenzióban kiterjedő polimer struktúra jön létre (15/B. ábra).

Mi lehet a DYNLL, illetve a Tctex esetén tapasztalt, ligandum kötés által indított, β -redő közvetített komplex-kapcsolódás fiziológiás jelentősége? Mint már említettem, a szabad β -élek funkciója általában éppen az, hogy a fehérjék egymáshoz kapcsolódását lehetővé tegyék. Erre számos példát találhatunk az irodalomban, elég csak az ilyen atomi felbontású szerkezetek adatbázisát (<http://icbs.ics.uci.edu/>) böngészni (196). A DYNLL, illetve a Tctex homodimerizációjában is ilyen, antiparallel β -redő kapcsolatok játszanak szerepet. A partnerek kötődésével új β -élek alakulnak ki, melyek a kötőárkokból kitüremkedve már képesek biztosítani az egyes komplexek egymással történő interakcióját. Miért lehet előnyös az élő sejteknek, hogy ilyen potenciálisan veszélyes, aggregációra hajlamos komplexek képződnek? Kísérleteink során a monomer VSRGTQTE-DYNLL komplex extrém gyors kristályosodást mutatott, viszont csak igen nagy koncentráció mellett (10^{-4} - 10^{-3} M). Ha ennek oka valóban a β -redők összekapcsolódása, akkor levonhatjuk a következtetést, hogy **az interakció meglehetősen gyenge, így a sejtekben igen valószínűtlen, hogy nagyfokú aggregációhoz vezet, sokkal inkább oligomerizációról, dinamikus kapcsolatról lehet szó.** Feltételezhetjük, hogy a Tctex esetén bemutatott interakciók sem túl erősek.

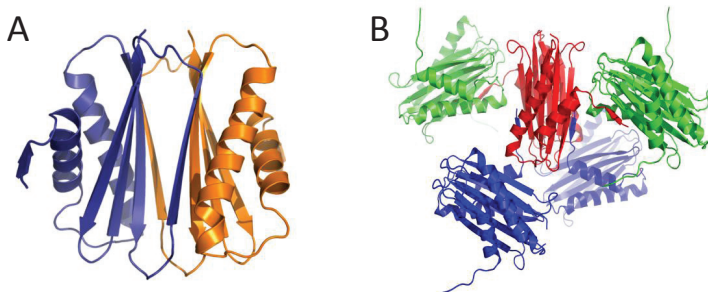
Nem feledkezhetünk meg azonban arról, hogy a sejtek belsejében lokálisan kialakulhat a DYNLL vagy a Tctex komplexeinek nagy koncentrációja, például akkor, ha kötőpartnereik sejtorganelumok membránfehérjei. Hasonló helyzet állhat elő az EML3 esetén is, mely mikrotubulusokat köt (149). Ha a mikrotubulus felszínén egymás közelében több EML3-DYNLL komplex helyezkedik el, akkor máris egy multivalens szupramolekuláris komplexről beszélhetünk, melynél felmerül az aviditás lehetősége. (Komplexek közötti aviditás!) Egy ilyen objektum kötődhet más, hasonló objektumokhoz a nagyszámú DYNLL-komplex egyenként gyenge, de összességében mégis erős kölcsönhatását kihasználva. **Ezáltal akár az egyes mikrotubulusok összekapcsolása (16/A. ábra), akár sejtorganelumok mikrotubulusokhoz történő horgonyzása is megvalósulhat (16/B. ábra).**



14. ábra: Az Alzheimer-kór kialakulásában szerepet játszó β -amiloid peptidekből kialakuló fibrillum atomi felbontású modellje (parallel β -redős struktúra) (206). Az oxigénatomokat piros, a nitrogéneket kék, míg a szénatomokat sárga színnel jelöltem. Csak a peptidgerinceket ábrázoltam. (A) A Tctex-DYNLL-IC hármas komplex (28) (pdb: 2PG1) kristályszerkezetében antiparallel β -redős kapcsolatok révén hosszú lineáris polimer „rudakat” lehet azonosítani. A Tctex kötőmotívumok esetén négy, míg a DYNLL esetén két hidrogénkötést figyelhetünk meg. (Utóbbi esetben nem a kötőmotívumok, hanem a DYNLL molekulák között.) A szalagmodelleken a DYNLL szürke, a dinein intermedier lánc (IC) zöld, a Tctex kék. A hidrogénkötéseket fekete szaggatott vonalak szimbolizálják. (B) A Tctex-DYNLL-IC hármas komplex (pdb: 3FM7) szerkezetét egy másik kutatócsoport is meghatározta (29). Ebben a szerkezetben is hasonló interakciókat fedezhetünk fel, mint a (B) ábrán, igaz itt a β -redő-mediált kötődés „mindössze” kettesével tarja össze az egymás melletti komplexeket. (C)

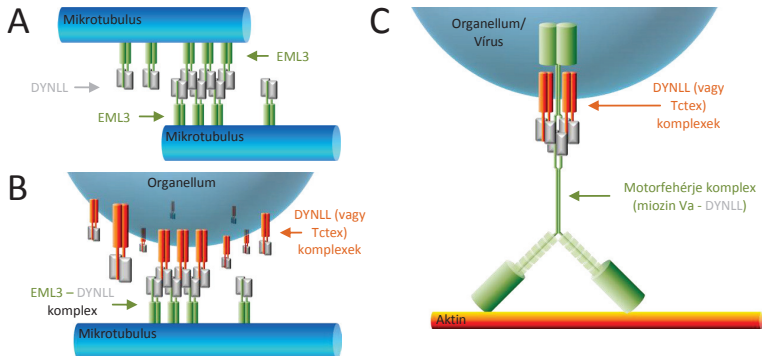
A hasonló, dinamikus oligomerizáció jelenlegi tudásunk szerint a fehérjék világában ritka, bár nem ismeretlen jelenség. Schwartz-Romond és munkatársai például a *Dishevelled* fehérje DIX doménjéről írták le, hogy dinamikus polimerizációja szükséges a fehérje szignalizációban betöltött szerepének megvalósulásához (208). A DIX domén *in vitro* oligo- és polimereket hozott létre koncentrációfüggő és reverzibilis módon. A kristályosítására tett kísérletek sikertelenek maradtak, mert – hasonlóan a monomer EML3 peptid-DYNLL komplex esetén tapasztaltakhoz (!)– a fehérje nagy koncentráció mellett kicsapódott, illetve számos körülmény esetén tükkristályok képződtek, melyek azonban a röntgen-diffrakciós szerkezet-meghatározásra alkalmatlanok voltak. Sikertült viszont egy

hasonló domént, az *axin* DIX-doménjét kristályosítani, mely szintén hajlamos az oligomerizációra. (A *Dishevelled* fehérje az axin inhibitora.) A kristályrácsban az egyes monomerek hosszú, helikális polimerekbe rendeződnek. A monomerek közötti interakciók részben β -redő kapcsolatokon keresztül valósulnak meg (208). (17. ábra)

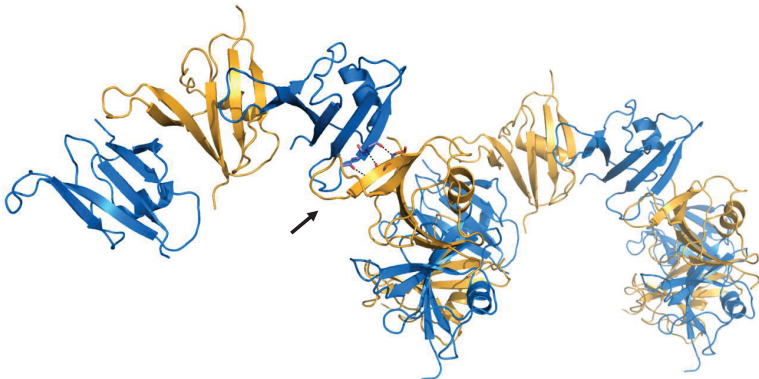


15. ábra: A Tctex röntgen-kristallográfiával meghatározott szerkezete (pdb: 1YGT). A dimer két láncát kék és narancs színek jelölik (207). (A) A középén látható Tctex dimer (piros) különös kristálykontaktusokat létesít: N-terminálisa a szomszédos dimerek (zöld) hidrofób kötőárkába illeszkedik, antiparallel β -redőként éppen úgy, mint ahogy azt a természetes ligandumok tennék. Más dimerek (kék) N-terminálisa pedig ehhez hasonló interakciót alakít ki a szabadon maradt kötőárkokkal (207). (B)

A DYNLL-ről régóta feltételezik, hogy kargó-adapter szerepe van *in vivo* (10, 11, 31-35), hiszen kötődik a dinein és a miozin Va motorfehérjékhez, valamint olyan fehérjékhez, melyeket ez a két motor szállít. A legkézenfekvőbb hipotézis az, hogy a DYNLL egyik kötőárkával a motorhoz, míg másikkal a szállított fehérjéhez kötődik. **A dolgozatomban bemutatott eredmények, illetve más kutatócsoportok eredményei** (6, 28, 36-40) szerint ennek a valószínűsége kicsi, hiszen a motorfehérjék és a szállított fehérjék is bivalens ligandumok, így dimer:dimer komplexek képződnek. Az általunk tett váratlan felfedezés talán ezt az ellentmondást is feloldja: amennyiben több DYNLL komplex egymással fizikai kapcsolatban van (pl. membránfelszínen, mikrotubuluson, vírusfelszínen stb.), lehetségessé válhat egy vagy több motorfehérje kötődése is, ha ezek szintén DYNLL-komplexet képeznek (16/C. ábra). Egy ilyen kapcsolat *in vitro*, vagy *in vivo* létezésének bizonyításához azonban a DYNLL (illetve a Tctex) esetén további kísérletek szükségesek.



16. ábra: A DYNLL (és Tctex) komplexek β -redő közvetített interakcióinak feltételezett biológiai funkciói. A DYNLL (szürke) - EML3 (zöld) komplexek a sejtvázasztatóban játszzhatnak szerepet az által, hogy a mikrotubulusokhoz (kék) kötődve egymáshoz kapcsolhatják azokat. (A) A DYNLL (és Tctex, szürke) komplexek membránnal határolt sejtorganelumokat horgonyozhatnak ki a mikrotubulusokhoz. (B) A DYNLL (szürke) és Tctex motorfehérjék ismert alegységei (DYNLL: dinein és miozin Va; Tctex: dinein). A miozin Va (zöld) - DYNLL komplex más hasonló komplexekhez kötődhet, melyek pl. sejtorganelumok, esetleg vírusrészcscék felszínén lokalizálódnak, ezáltal megvalósulhat a DYNLL kargó-adapter funkciója. (C)



17. ábra: Az axin DIX-doménjének kristályszerkezete (pdb: 1WSP, (208)). A kristályrácsban az egyes monomerek (váltakozva kék és narancs színnel) hosszú, helikális polimerekbe rendeződnek, ahol részben rövid, parallel β -redő kapcsolatokon (nyíl) keresztül valósul meg a monomerek egymáshoz történő kötődése (208).

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Dr. Nyitrai Lászlónak*, aki lehetővé tette számomra, hogy munkámat már szakdolgozó korom óta kutatócsoportjának tagjaként végezzem. Segítette tudományos pályafutásomat, irányította munkámat, de mindig támogatta önálló ötleteim megvalósítását is.

Köszönöm *Dr. Erdei Annának* és *Dr. Gráf Lászlónak*, hogy tanulmányaimat a Biológia Doktori Iskola Szerkezeti Biokémia Programjában végezhettem el.

Szeretném megköszönni *Dr. Hegyi Györgynek*, *Dr. Pál Gábornak*, *Dr. Kovács Mihálynak* és *Dr. Kardos Józsefnek* a sok szakmai segítséget és az átadott tudást.

Köszönet illeti *Dr. Harmat Veronika*, *Dr. Katona Gergely*, *Weixiao Wahlgren*, *Dr. Bodor Andrea*, *Dr. Perczel András*, *Bécsi Bálint*, *Dr. Erdődi Ferenc*, *Dr. Kékesi Katalin* és *Dr. Patthy András* együttműködő partnereinket, akik nagyban hozzájárultak tudományos eredményeim eléréséhez.

Köszönöm az ELTE Biokémiai Tanszék oktatóinak, doktoranduszainak és hallgatóinak a sok segítséget a közös munkát és a jó hangulatot. Szeretném kiemelni *Rapali Pétert*, akivel a doktori évek kezdetétől sok esetben sikeresen együtt dolgoztunk. A dolgozatomban bemutatott eredményeket is részben közösen sikerült elérnünk. Kiemelném továbbá *Hódi Zsuzsát*, akinek kitartó munkája teremtette meg az alapot számos későbbi kutatáshoz, így az én munkámhoz is.

Szeretnék köszönetet mondani *Családomnak*, akik gyermekkorom óta támogattak, segítettek tanulmányaimban és felkeltették érdeklődésem a természettudományok iránt.

Külön köszönöm *Páromnak*, *Völgyi Katalinnak*, hogy dolgozatom megírásának munkával teli időszakában sokat biztatott és segített, vidámságával lelkesített és mindig mellettem állt.

10. Publikációs lista

10.1. A doktori dolgozat témájában megjelent közlemények

Referált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények (aláhúzással kiemelve a dolgozat alapjául szolgáló közlemények):

Hódi, Z.; Németh, A. L.; **Radnai, L.**; Hetényi, C.; Schlett, K.; Bodor, A.; Perczel, A.; Nyitray, L. (2006). "Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein." *Biochemistry*. 2006 Oct 17;45(41):12582-95.

Radnai, L.; Rapali, P.; Hódi, Z.; Süveges, D.; Molnár, T.; Kiss, B.; Bécsi, B.; Erdődi, F.; Buday, L.; Kardos, J.; Kovács, M.; Nyitray, L. (2010). "Affinity, avidity and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms" *J Biol Chem*. 2010 Dec 3;285(49):38649-57. Epub 2010 Oct 2.

Rapali, P., **Radnai, L.**, Süveges, D., Harmat, V., Tölgyesi, F., Wahlgren, W.Y., Katona, G., Nyitray, L., Pál, G. (2011). "Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel binders in the human proteome." *PLoS One*. 2011 Apr 18;6(4):e18818.

Rapali, P., Szenes, Á., **Radnai, L.**, Bakos, A., Pál, G., Nyitray, L. (2011). „DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond.” *FEBS J*. 2011 Sep;278(17):2980-96. Epub 2011 Aug 8. Review.

Bodor, A., **Radnai, L.**, Chazal, R., Tichy-Rács, A., Wahlgren, W.Y., Rapali, P., Süveges, D., Láng, A., Kövér, E.K., Harmat, V., Katona, G., Perczel, A., Nyitray, L. (2012) Binding of an unstructured myosin Va fragment to the LC8 dynein light chain (DYNLL) *Kézirat előkészítése folyamatban*

Molnár, T., Rapali, P., Bakos, A., **Radnai, L.**, Süveges, D., Kiss, B., Biri, B., and Nyitray, L. (2012) Novel regulatory mechanisms of LC8 Dynein Light Chain eukaryotic hub protein *Kézirat előkészítése folyamatban*

Magyar nyelvű folyóiratban megjelent közlemények:

Rapali, P., Radnai, L., Süveges, D., Harmat, V., Wahlgren, W.Y., Katona, G., Nyitray, L. és Pál, G. (2010) „Az LC8 Dinein könnyűlánc kötőmotívumának jellemzés és új kölcsönható partnerek jóslása irányított evolúció segítségével.” *Biokémia*, (2010) 34(4), 28-34

Nemzetközi konferencián bemutatott eredmények:

Hódi, Z; Rapali, P; **Radnai, L**; Molnár, T; Szenes, A; Kardos, J; Buday, L; Stafford, WF; Nyitray, L (2007). "The LC8 family of dynein light chains: Multifunctional chaperon-like proteins."

32nd FEBS Congress (Vienna, Austria 7–12 July, 2007); FEBS JOURNAL 274: 106–106.

Andrea Bodor, András Láng, Péter Rapali, **László Radnai**, László Nyitray, András Perczel (2008) „Structural and dynamical characterization of an unstructured myosin fragment (M) upon binding to the dimeric dynein light chain (DLC)”

4th Central European Conference: Chemistry towards Biology (Dobogókő, Hungary September 8–11, 2008)

Péter Rapali, **László Radnai**, József Kardos, Dániel Süveges, Tamás Molnár, Bence Kiss, Zsuzsa Hódi, László Nyitray (2008) „Mechanism of DLC binding to multiple protein partners”

4th Central European Conference: Chemistry towards Biology (Dobogókő, Hungary. September 8–11, 2008)

Dániel Süveges, Péter Rapali, **László Radnai**, Weixiao Wahlgren, Gergely Katona, László Nyitray (2010) „Echinoderm microtubule associated protein like 3 (EML3): a novel binding partner of the dynein light chain, DYNLL”

35th FEBS Congress (Göteborg, Sweden, 26 June - 1 July, 2010); FEBS JOURNAL 277 (Suppl. 1) 301–302 (2010)

Péter Rapali, **László Radnai**, Veronika Harmat, Weixiao Wahlgren, Gergely Katona, Csaba Hetényi, Gábor Pál, László Nyitray (2010) „Affinity enhancement of linear peptide motifs by in vitro evolution: the case of dynein light chain (DYNLL) binding peptides”

5th Central European Conference: Chemistry towards Biology (Primošten, Croatia, September 8–11, 2010)

László Radnai, Péter Rapali, Alíz Tichy-Rács, Csaba Hetényi, Veronika Harmat, Weixiao Wahlgren, Gergely Katona, László Nyitray (2010) ”Interaction of the LC8 dynein light chain with myosin Va and EML3: structural studies”

5th Central European Conference: Chemistry towards Biology (Primošten, Croatia, September 8–11, 2010)

Péter Rapali, Áron Szenes, **László Radnai**, Anita Bakos, Vince Grolmusz, Gábor Pál, László Nyitray (2011) „DYNLL/LC8: a hub protein that recognizes linear peptide motifs localized in disordered segments of its interaction partners.” „DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond.”

4th European Conference on Chemistry for Life Sciences (Budapest, Hungary, 3 August – 3 September, 2011)

10.2. Egyéb közlemények

Referált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények:

Kiss B, Duelli A, **Radnai L**, Kékesi KA, Katona G, Nyitray L. (2012). „Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism.”

Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Apr 17;109(16):6048-53. Epub 2012 Mar 28.

Nemzetközi konferencián bemutatott eredmények:

Bence Kiss, Annette Duelli, **László Radnai**, Gergely Katona, László Nyitray (2011) „Hugging interaction: a unique binding of myosin IIA to metastasis-associated protein S100A4.”

40th European Muscle Conference (Berlin, Germany, September 14-18, 2011)

Bence Kiss, Annette Duelli, **László Radnai**, Katalin A. Kékesi, Gergely Katona, László Nyitray (2012) „Hugging Interaction: Asymmetric Binding of Metastasis Associated Protein S100A4 to Non-Muscle Myosin 2A Tail”

Biophysical Society 56th Annual Meeting (San Diego, California, February 25-29, 2012); Biophysical journal (volume 102 issue 3 pp.462a - 463a)

11. Hivatkozások jegyzéke

1. Patil, A., Kinoshita, K., and Nakamura, H. (2010) Hub promiscuity in protein-protein interaction networks, *Int J Mol Sci* 11, 1930-1943.
2. Keskin, O., Gurses, A., Ma, B., and Nussinov, R. (2008) Principles of protein-protein interactions: what are the preferred ways for proteins to interact?, *Chem Rev* 108, 1225-1244.
3. Jeong, H., Mason, S. P., Barabasi, A. L., and Oltvai, Z. N. (2001) Lethality and centrality in protein networks, *Nature* 411, 41-42.
4. He, X., and Zhang, J. (2006) Why do hubs tend to be essential in protein networks?, *PLoS Genet* 2, e88.
5. Pfister, K. K., Fisher, E. M., Gibbons, I. R., Hays, T. S., Holzbaur, E. L., McIntosh, J. R., Porter, M. E., Schroer, T. A., Vaughan, K. T., Witman, G. B., King, S. M., and Vallee, R. B. (2005) Cytoplasmic dynein nomenclature, *J Cell Biol* 171, 411-413.
6. Barbar, E. (2008) Dynein light chain LC8 is a dimerization hub essential in diverse protein networks, *Biochemistry* 47, 503-508.
7. King, S. M., and Patel-King, R. S. (1995) The M(r) = 8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from Chlamydomonas flagella have cytoplasmic homologues, *J Biol Chem* 270, 11445-11452.
8. Espindola, F. S., Suter, D. M., Partata, L. B., Cao, T., Wolenski, J. S., Cheney, R. E., King, S. M., and Mooseker, M. S. (2000) The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN, *Cell Motil Cytoskeleton* 47, 269-281.
9. Rapali, P., Szenes, A., Radnai, L., Bakos, A., Pal, G., and Nyitrai, L. (2011) DYNLL/LC8: a light chain subunit of the dynein motor complex and beyond, *FEBS J* 278, 2980-2996.
10. Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., and Strasser, A. (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis, *Science* 293, 1829-1832.
11. Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., and Strasser, A. (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex, *Mol Cell* 3, 287-296.
12. Jaffrey, S. R., and Snyder, S. H. (1996) PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, *Science* 274, 774-777.
13. Rayala, S. K., den Hollander, P., Balasenthil, S., Yang, Z., Broadus, R. R., and Kumar, R. (2005) Functional regulation of oestrogen receptor pathway by the dynein light chain 1, *EMBO Rep* 6, 538-544.
14. Vadlamudi, R. K., Bagheri-Yarmand, R., Yang, Z., Balasenthil, S., Nguyen, D., Sahin, A. A., den Hollander, P., and Kumar, R. (2004) Dynein light chain 1, a p21-activated kinase 1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes, *Cancer Cell* 5, 575-585.
15. Lu, J., Sun, Q., Chen, X., Wang, H., Hu, Y., and Gu, J. (2005) Identification of dynein light chain 2 as an interaction partner of p21-activated kinase 1, *Biochem Biophys Res Commun* 331, 153-158.
16. Schnorrer, F., Bohmann, K., and Nusslein-Volhard, C. (2000) The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of Drosophila oocytes, *Nat Cell Biol* 2, 185-190.
17. Stelter, P., Kunze, R., Flemming, D., Hopfner, D., Diepholz, M., Philippsen, P., Bottcher, B., and Hurt, E. (2007) Molecular basis for the functional interaction of dynein light chain with the nuclear-pore complex, *Nat Cell Biol* 9, 788-796.
18. Merino-Gracia, J., Garcia-Mayoral, M. F., and Rodriguez-Crespo, I. (2011) The association of viral proteins with host cell dynein components during virus infection, *FEBS J* 278, 2997-3011.
19. Dodding, M. P., and Way, M. (2011) Coupling viruses to dynein and kinesin-1, *EMBO J* 30, 3527-3539.
20. Dick, T., Ray, K., Salz, H. K., and Chia, W. (1996) Cytoplasmic dynein (ddc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in Drosophila melanogaster, *Mol Cell Biol* 16, 1966-1977.
21. Fan, J., Zhang, Q., Tochio, H., Li, M., and Zhang, M. (2001) Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain, *J Mol Biol* 306, 97-108.
22. Day, C. L., Puthalakath, H., Skea, G., Strasser, A., Barsukov, I., Lian, L. Y., Huang, D. C., and Hinds, M. G. (2004) Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands, *Biochem J* 377, 597-605.

23. Vedadi, M., Lew, J., Artz, J., Amani, M., Zhao, Y., Dong, A., Wasney, G. A., Gao, M., Hills, T., Brokx, S., Qiu, W., Sharma, S., Diassiti, A., Alam, Z., Melone, M., Mulichak, A., Wernimont, A., Bray, J., Loppnau, P., Plotnikova, O., Newberry, K., Sundararajan, E., Houston, S., Walker, J., Tempel, W., Bochkarev, A., Kozieradzki, I., Edwards, A., Arrowsmith, C., Roos, D., Kain, K., and Hui, R. (2007) Genome-scale protein expression and structural biology of Plasmodium falciparum and related Apicomplexan organisms, *Mol Biochem Parasitol* 151, 100-110.
24. Lightcap, C. M., Sun, S., Lear, J. D., Rodeck, U., Polenova, T., and Williams, J. C. (2008) Biochemical and structural characterization of the Pak1-LC8 interaction, *J Biol Chem* 283, 27314-27324.
25. Benison, G., Karplus, P. A., and Barbar, E. (2008) The interplay of ligand binding and quaternary structure in the diverse interactions of dynein light chain LC8, *J Mol Biol* 384, 954-966.
26. Liang, J., Jaffrey, S. R., Guo, W., Snyder, S. H., and Clardy, J. (1999) Structure of the PIN/LC8 dimer with a bound peptide, *Nat Struct Biol* 6, 735-740.
27. Benison, G., Karplus, P. A., and Barbar, E. (2007) Structure and dynamics of LC8 complexes with KXTQT-motif peptides: swallow and dynein intermediate chain compete for a common site, *J Mol Biol* 371, 457-468.
28. Williams, J. C., Roulhac, P. L., Roy, A. G., Vallee, R. B., Fitzgerald, M. C., and Hendrickson, W. A. (2007) Structural and thermodynamic characterization of a cytoplasmic dynein light chain-intermediate chain complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10028-10033.
29. Hall, J., Karplus, P. A., and Barbar, E. (2009) Multivalency in the assembly of intrinsically disordered Dynein intermediate chain, *J Biol Chem* 284, 33115-33121.
30. Hodi, Z., Rapali, P., Radnai, L., Molnar, T., Szenes, A., Kardos, J., Buday, L., Stafford, W., and Nyitrai, L. (2007) The LC8 family of dynein light chains: Multifunctional chaperon-like proteins, *FEBS JOURNAL* 274, 106-106.
31. Naisbitt, S., Valtchanoff, J., Allison, D. W., Sala, C., Kim, E., Craig, A. M., Weinberg, R. J., and Sheng, M. (2000) Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein, *J Neurosci* 20, 4524-4534.
32. Pfister, K. K., Shah, P. R., Hummerich, H., Russ, A., Cotton, J., Annuar, A. A., King, S. M., and Fisher, E. M. (2006) Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families, *PLoS Genet* 2, e1.
33. Fejtova, A., Davydova, D., Bischof, F., Lazarevic, V., Altrock, W. D., Romorini, S., Schone, C., Zuschratter, W., Kreutz, M. R., Garner, C. C., Ziv, N. E., and Gundelfinger, E. D. (2009) Dynein light chain regulates axonal trafficking and synaptic levels of Bassoon, *J Cell Biol* 185, 341-355.
34. Alonso, C., Miskin, J., Hernaez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Canto, C., Rodriguez-Crespo, I., Dixon, L., and Escribano, J. M. (2001) African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein, *J Virol* 75, 9819-9827.
35. Su, Y., Qiao, W., Guo, T., Tan, J., Li, Z., Chen, Y., Li, X., Li, Y., Zhou, J., and Chen, Q. (2010) Microtubule-dependent retrograde transport of bovine immunodeficiency virus, *Cell Microbiol* 12, 1098-1107.
36. Cheney, R. E., O'Shea, M. K., Heuser, J. E., Coelho, M. V., Wolenski, J. S., Espreafico, E. M., Forscher, P., Larson, R. E., and Mooseker, M. S. (1993) Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity, *Cell* 75, 13-23.
37. Sakakibara, H., and Oiwa, K. (2011) Molecular organization and force-generating mechanism of dynein, *FEBS J* 278, 2964-2979.
38. Benison, G., Nyarko, A., and Barbar, E. (2006) Heteronuclear NMR identifies a nascent helix in intrinsically disordered dynein intermediate chain: implications for folding and dimerization, *J Mol Biol* 362, 1082-1093.
39. Hodi, Z., Nemeth, A. L., Radnai, L., Hetenyi, C., Schlett, K., Bodor, A., Perczel, A., and Nyitrai, L. (2006) Alternatively spliced exon B of myosin Va is essential for binding the tail-associated light chain shared by dynein, *Biochemistry* 45, 12582-12595.
40. Wang, L., Hare, M., Hays, T. S., and Barbar, E. (2004) Dynein light chain LC8 promotes assembly of the coiled-coil domain of swallow protein, *Biochemistry* 43, 4611-4620.
41. King, S. M., Barbarese, E., Dillman, J. F., 3rd, Patel-King, R. S., Carson, J. H., and Pfister, K. K. (1996) Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain, *J Biol Chem* 271, 19358-19366.
42. Lo, K. W., Kogoy, J. M., Rasoul, B. A., King, S. M., and Pfister, K. K. (2007) Interaction of the DYNLT (TCTEX1/ RP3) light chains and the intermediate chains reveals novel intersubunit regulation during assembly of the dynein complex, *J Biol Chem* 282, 36871-36878.
43. Rodriguez-Crespo, I., Yelamos, B., Roncal, F., Albar, J. P., Ortiz de Montellano, P. R., and Gavilanes, F. (2001) Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique, *FEBS Lett* 503, 135-141.

44. Lo, K. W., Naisbitt, S., Fan, J. S., Sheng, M., and Zhang, M. (2001) The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif, *J Biol Chem* 276, 14059-14066.
45. Hall, J., Hall, A., Pursifull, N., and Barbar, E. (2008) Differences in dynamic structure of LC8 monomer, dimer, and dimer-peptide complexes, *Biochemistry* 47, 11940-11952.
46. Song, C., Wen, W., Rayala, S. K., Chen, M., Ma, J., Zhang, M., and Kumar, R. (2008) Serine 88 phosphorylation of the 8-kDa dynein light chain 1 is a molecular switch for its dimerization status and functions, *J Biol Chem* 283, 4004-4013.
47. Wagner, W., Fodor, E., Ginsburg, A., and Hammer, J. A., 3rd. (2006) The binding of DYNLL2 to myosin Va requires alternatively spliced exon B and stabilizes a portion of the myosin's coiled-coil domain, *Biochemistry* 45, 11564-11577.
48. Nyarko, A., Hare, M., Hays, T. S., and Barbar, E. (2004) The intermediate chain of cytoplasmic dynein is partially disordered and gains structure upon binding to light-chain LC8, *Biochemistry* 43, 15595-15603.
49. Song, Y., Benison, G., Nyarko, A., Hays, T. S., and Barbar, E. (2007) Potential role for phosphorylation in differential regulation of the assembly of dynein light chains, *J Biol Chem* 282, 17272-17279.
50. Lei, K., and Davis, R. J. (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2432-2437.
51. Yang, Z., Vadlamudi, R. K., and Kumar, R. (2005) Dynein light chain 1 phosphorylation controls macropinocytosis, *J Biol Chem* 280, 654-659.
52. Jeong, W., Jung, Y., Kim, H., Park, S. J., and Rhee, S. G. (2009) Thioredoxin-related protein 14, a new member of the thioredoxin family with disulfide reductase activity: implication in the redox regulation of TNF-alpha signaling, *Free Radic Biol Med* 47, 1294-1303.
53. Jurado, S., Conlan, L. A., Baker, E. K., Ng, J. L., Tennis, N., Hoch, N. C., Gleeson, K., Smeets, M., Izon, D., and Heierhorst, J. (2012) ATM substrate Chk2-interacting Zn2+ finger (ASCIZ) Is a bi-functional transcriptional activator and feedback sensor in the regulation of dynein light chain (DYNLL1) expression, *J Biol Chem* 287, 3156-3164.
54. Pinon, J. D., Labi, V., Egle, A., and Villunger, A. (2008) Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease, *Oncogene* 27 Suppl 1, S41-52.
55. VanBrocklin, M. W., Verhaegen, M., Soengas, M. S., and Holmen, S. L. (2009) Mitogen-activated protein kinase inhibition induces translocation of Bmf to promote apoptosis in melanoma, *Cancer Res* 69, 1985-1994.
56. Shao, Y., and Aplin, A. E. (2012) ERK2 phosphorylation of serine 77 regulates Bmf pro-apoptotic activity, *Cell Death Dis* 3, e253.
57. Show, M. D., Hill, C. M., Anway, M. D., Wright, W. W., and Zirkin, B. R. (2008) Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8) is associated with germ cell apoptosis and redistribution of the Bcl2-modifying factor (BMF), *J Androl* 29, 338-344.
58. Kepp, O., Gottschalk, K., Churin, Y., Rajalingam, K., Brinkmann, V., Machuy, N., Kroemer, G., and Rudel, T. (2009) Bim and Bmf synergize to induce apoptosis in Neisseria gonorrhoeae infection, *PLoS Pathog* 5, e1000348.
59. Kilbride, S. M., Farrelly, A. M., Bonner, C., Ward, M. W., Nyhan, K. C., Concannon, C. G., Wollheim, C. B., Byrne, M. M., and Prehn, J. H. (2010) AMP-activated protein kinase mediates apoptosis in response to bioenergetic stress through activation of the pro-apoptotic Bcl-2 homology domain-3-only protein BMF, *J Biol Chem* 285, 36199-36206.
60. Hubner, A., Cavanagh-Kyros, J., Rincon, M., Flavell, R. A., and Davis, R. J. (2010) Functional cooperation of the proapoptotic Bcl2 family proteins Bmf and Bim in vivo, *Mol Cell Biol* 30, 98-105.
61. Labi, V., Erlacher, M., Kiessling, S., Manzl, C., Frenzel, A., O'Reilly, L., Strasser, A., and Villunger, A. (2008) Loss of the BH3-only protein Bmf impairs B cell homeostasis and accelerates gamma irradiation-induced thymic lymphoma development, *J Exp Med* 205, 641-655.
62. Gramantieri, L., Fornari, F., Ferracin, M., Veronese, A., Sabbioni, S., Calin, G. A., Grazi, G. L., Croce, C. M., Bolondi, L., and Negrini, M. (2009) MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality, *Clin Cancer Res* 15, 5073-5081.
63. Xia, H. F., He, T. Z., Liu, C. M., Cui, Y., Song, P. P., Jin, X. H., and Ma, X. (2009) MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf, *Cell Physiol Biochem* 23, 347-358.
64. Frenzel, A., Labi, V., Chmielewski, W., Ploner, C., Geley, S., Fiegl, H., Tzankov, A., and Villunger, A. (2010) Suppression of B-cell lymphomagenesis by the BH3-only proteins Bmf and Bad, *Blood* 115, 995-1005.

65. Baumgartner, F., Woess, C., Pedit, V., Tzankov, A., Labi, V., and Villunger, A. (2012) Minor cell-death defects but reduced tumor latency in mice lacking the BH3-only proteins Bad and Bmf, *Oncogene*.
66. Mailleux, A. A., Overholtzer, M., Schmelzle, T., Bouillet, P., Strasser, A., and Brugge, J. S. (2007) BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms, *Dev Cell* 12, 221-234.
67. Schmelzle, T., Mailleux, A. A., Overholtzer, M., Carroll, J. S., Solimini, N. L., Lightcap, E. S., Veiby, O. P., and Brugge, J. S. (2007) Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3787-3792.
68. Whelan, K. A., Caldwell, S. A., Shahriari, K. S., Jackson, S. R., Franchetti, L. D., Johannes, G. J., and Reginato, M. J. (2010) Hypoxia suppression of Bim and Bmf blocks anoikis and luminal clearing during mammary morphogenesis, *Mol Biol Cell* 21, 3829-3837.
69. Youle, R. J., and Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
70. Kutuk, O., and Letai, A. (2010) Displacement of Bim by Bmf and Puma rather than increase in Bim level mediates paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells, *Cell Death Differ* 17, 1624-1635.
71. Larson, R. E., Pitta, D. E., and Ferro, J. A. (1988) A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin, *Braz J Med Biol Res* 21, 213-217.
72. Larson, R. E., Espindola, F. S., and Espreafico, E. M. (1990) Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin, *J Neurochem* 54, 1288-1294.
73. Espindola, F. S., Espreafico, E. M., Coelho, M. V., Martins, A. R., Costa, F. R., Mooseker, M. S., and Larson, R. E. (1992) Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin, *J Cell Biol* 118, 359-368.
74. Espreafico, E. M., Cheney, R. E., Matteoli, M., Nascimento, A. A., De Camilli, P. V., Larson, R. E., and Mooseker, M. S. (1992) Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains, *J Cell Biol* 119, 1541-1557.
75. Trybus, K. M. (2008) Myosin V from head to tail, *Cell Mol Life Sci* 65, 1378-1389.
76. Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor, *Nature* 400, 590-593.
77. Walker, M. L., Burgess, S. A., Sellers, J. R., Wang, F., Hammer, J. A., 3rd, Trinick, J., and Knight, P. J. (2000) Two-headed binding of a processive myosin to F-actin, *Nature* 405, 804-807.
78. Purcell, T. J., Morris, C., Spudich, J. A., and Sweeney, H. L. (2002) Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14159-14164.
79. Sakamoto, T., Wang, F., Schmitz, S., Xu, Y., Xu, Q., Molloy, J. E., Veigel, C., and Sellers, J. R. (2003) Neck length and processivity of myosin V, *J Biol Chem* 278, 29201-29207.
80. Oke, O. A., Burgess, S. A., Forgacs, E., Knight, P. J., Sakamoto, T., Sellers, J. R., White, H., and Trinick, J. (2010) Influence of lever structure on myosin 5a walking, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2509-2514.
81. Schott, D. H., Collins, R. N., and Bretscher, A. (2002) Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length, *J Cell Biol* 156, 35-39.
82. Sakamoto, T., Amitani, I., Yokota, E., and Ando, T. (2000) Direct observation of processive movement by individual myosin V molecules, *Biochem Biophys Res Commun* 272, 586-590.
83. Lu, H., Kennedy, G. G., Warshaw, D. M., and Trybus, K. M. (2010) Simultaneous observation of tail and head movements of myosin V during processive motion, *J Biol Chem* 285, 42068-42074.
84. Zhang, R., Rothenberg, E., Fruhwirth, G., Simonson, P. D., Ye, F., Golding, I., Ng, T., Lopes, W., and Selvin, P. R. (2011) Two-photon 3D FIONA of individual quantum dots in an aqueous environment, *Nano Lett* 11, 4074-4078.
85. Levi, V., Gelfand, V. I., Serpinsky, A. S., and Gratton, E. (2006) Melanosomes transported by myosin-V in *Xenopus* melanophores perform slow 35 nm steps, *Biophys J* 90, L07-09.
86. Stachek, S. J., Tuft, R. A., Lifschitz, L. M., Leonard, D. M., Farwell, A. P., and Leonard, J. L. (2001) Real-time visualization of processive myosin 5a-mediated vesicle movement in living astrocytes, *J Biol Chem* 276, 35652-35659.
87. Nelson, S. R., Ali, M. Y., Trybus, K. M., and Warshaw, D. M. (2009) Random walk of processive, quantum dot-labeled myosin Va molecules within the actin cortex of COS-7 cells, *Biophys J* 97, 509-518.
88. Pierobon, P., Achouri, S., Courty, S., Dunn, A. R., Spudich, J. A., Dahan, M., and Cappello, G. (2009) Velocity, processivity, and individual steps of single myosin V molecules in live cells, *Biophys J* 96, 4268-4275.

89. Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., and Selvin, P. R. (2003) Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization, *Science* **300**, 2061-2065.
90. Snyder, G. E., Sakamoto, T., Hammer, J. A., 3rd, Sellers, J. R., and Selvin, P. R. (2004) Nanometer localization of single green fluorescent proteins: evidence that myosin V walks hand-over-hand via telemark configuration, *Biophys J* **87**, 1776-1783.
91. Warsaw, D. M., Kennedy, G. G., Work, S. S., Kremenstova, E. B., Beck, S., and Trybus, K. M. (2005) Differential labeling of myosin V heads with quantum dots allows direct visualization of hand-over-hand processivity, *Biophys J* **88**, L30-32.
92. Churchman, L. S., Okten, Z., Rock, R. S., Dawson, J. F., and Spudich, J. A. (2005) Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1419-1423.
93. Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R., and Ando, T. (2010) Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy, *Nature* **468**, 72-76.
94. Lambert, J., Naeyaert, J. M., Callens, T., De Paepe, A., and Messiaen, L. (1998) Human myosin V gene produces different transcripts in a cell type-specific manner, *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 329-333.
95. Roland, J. T., Lapierre, L. A., and Goldenring, J. R. (2009) Alternative splicing in class V myosins determines association with Rab10, *J Biol Chem* **284**, 1213-1223.
96. Wu, X., Wang, F., Rao, K., Sellers, J. R., and Hammer, J. A., 3rd. (2002) Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va, *Mol Biol Cell* **13**, 1735-1749.
97. Langford, G. M. (2002) Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport, *Traffic* **3**, 859-865.
98. Hammer, J. A., 3rd, and Sellers, J. R. (2012) Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters, *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 13-26.
99. Wang, F. S., Wolenski, J. S., Cheney, R. E., Mooseker, M. S., and Jay, D. G. (1996) Function of myosin-V in filopodial extension of neuronal growth cones, *Science* **273**, 660-663.
100. Wagner, W., Brenowitz, S. D., and Hammer, J. A., 3rd. (2011) Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons, *Nat Cell Biol* **13**, 40-48.
101. Evans, L. L., Lee, A. J., Bridgman, P. C., and Mooseker, M. S. (1998) Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport, *J Cell Sci* **111 (Pt 14)**, 2055-2066.
102. Bridgman, P. C. (1999) Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex, *J Cell Biol* **146**, 1045-1060.
103. Prekeris, R., and Terrian, D. M. (1997) Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex, *J Cell Biol* **137**, 1589-1601.
104. Ohyama, A., Komiya, Y., and Igarashi, M. (2001) Globular tail of myosin-V is bound to vamp/synaptobrevin, *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 988-991.
105. Watanabe, M., Nomura, K., Ohyama, A., Ishikawa, R., Komiya, Y., Hosaka, K., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Sasakawa, N., Kumakura, K., Ushiki, T., Sato, O., Ikebe, M., and Igarashi, M. (2005) Myosin-Va regulates exocytosis through the submicromolar Ca²⁺-dependent binding of syntaxin-1A, *Mol Biol Cell* **16**, 4519-4530.
106. Correia, S. S., Bassani, S., Brown, T. C., Lise, M. F., Backos, D. S., El-Husseini, A., Passafaro, M., and Esteban, J. A. (2008) Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation, *Nat Neurosci* **11**, 457-466.
107. van Diepen, M. T., Parsons, M., Downes, C. P., Leslie, N. R., Hindges, R., and Eickholt, B. J. (2009) MyosinV controls PTEN function and neuronal cell size, *Nat Cell Biol* **11**, 1191-1196.
108. Lise, M. F., Srivastava, D. P., Arstikaitis, P., Lett, R. L., Sheta, R., Viswanathan, V., Penzes, P., O'Connor, T. P., and El-Husseini, A. (2009) Myosin-Va-interacting protein, RILPL2, controls cell shape and neuronal morphogenesis via Rac signaling, *J Cell Sci* **122**, 3810-3821.
109. Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B., and Hammer, J. A., 3rd. (1997) Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor, *J Cell Sci* **110 (Pt 7)**, 847-859.
110. Lambert, J., Onderwater, J., Vander Haeghen, Y., Vancollie, G., Koerten, H. K., Mommaas, A. M., and Naeyaert, J. M. (1998) Myosin V colocalizes with melanosomes and subcortical actin bundles not associated with stress fibers in human epidermal melanocytes, *J Invest Dermatol* **111**, 835-840.
111. Wei, Q., Wu, X., and Hammer, J. A., 3rd. (1997) The predominant defect in dilute melanocytes is in melanosome distribution and not cell shape, supporting a role for myosin V in melanosome transport, *J Muscle Res Cell Motil* **18**, 517-527.

112. Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., and Hammer, J. A., 3rd. (1998) Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo, *J Cell Biol* 143, 1899-1918.
113. Edgar, A. J., and Bennett, J. P. (1999) Inhibition of dendrite formation in mouse melanocytes transiently transfected with antisense DNA to myosin Va, *J Anat* 195 (Pt 2), 173-184.
114. Bahadoran, P., Aberdam, E., Mantoux, F., Busca, R., Bille, K., Yalman, N., de Saint-Basile, G., Casaroli-Marano, R., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (2001) Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes, *J Cell Biol* 152, 843-850.
115. Wu, X., Rao, K., Bowers, M. B., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Hammer, J. A., 3rd. (2001) Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle, *J Cell Sci* 114, 1091-1100.
116. Strom, M., Hume, A. N., Tarafder, A. K., Barkagianni, E., and Seabra, M. C. (2002) A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport, *J Biol Chem* 277, 25423-25430.
117. Nagashima, K., Torii, S., Yi, Z., Igarashi, M., Okamoto, K., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002) Melanophilin directly links Rab27a and myosin Va through its distinct coiled-coil regions, *FEBS Lett* 517, 233-238.
118. Fukuda, M., Kuroda, T. S., and Mikoshiba, K. (2002) Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport, *J Biol Chem* 277, 12432-12436.
119. Wu, X., Sakamoto, T., Zhang, F., Sellers, J. R., and Hammer, J. A., 3rd. (2006) In vitro reconstitution of a transport complex containing Rab27a, melanophilin and myosin Va, *FEBS Lett* 580, 5863-5868.
120. Provance, D. W., James, T. L., and Mercer, J. A. (2002) Melanophilin, the product of the leaden locus, is required for targeting of myosin-Va to melanosomes, *Traffic* 3, 124-132.
121. Hume, A. N., Ushakov, D. S., Tarafder, A. K., Ferenczi, M. A., and Seabra, M. C. (2007) Rab27a and MyoVa are the primary Mlph interactors regulating melanosome transport in melanocytes, *J Cell Sci* 120, 3111-3122.
122. Wu, X. S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J. R., Matesic, L. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Hammer, J. A., 3rd. (2002) Identification of an organelle receptor for myosin-Va, *Nat Cell Biol* 4, 271-278.
123. Westbroek, W., Lambert, J., Bahadoran, P., Busca, R., Herteleer, M. C., Smit, N., Mommaas, M., Ballotti, R., and Naeyaert, J. M. (2003) Interactions of human Myosin Va isoforms, endogenously expressed in human melanocytes, are tightly regulated by the tail domain, *J Invest Dermatol* 120, 465-475.
124. Fukuda, M., and Kuroda, T. S. (2004) Missense mutations in the globular tail of myosin-Va in dilute mice partially impair binding of Slac2-a/melanophilin, *J Cell Sci* 117, 583-591.
125. Geething, N. C., and Spudich, J. A. (2007) Identification of a minimal myosin Va binding site within an intrinsically unstructured domain of melanophilin, *J Biol Chem* 282, 21518-21528.
126. Hume, A. N., Tarafder, A. K., Ramalho, J. S., Sviderskaya, E. V., and Seabra, M. C. (2006) A coiled-coil domain of melanophilin is essential for Myosin Va recruitment and melanosome transport in melanocytes, *Mol Biol Cell* 17, 4720-4735.
127. Zhou, L., and Zhu, D. Y. (2009) Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications, *Nitric Oxide* 20, 223-230.
128. Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A., and Stella, A. M. (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity, *Nat Rev Neurosci* 8, 766-775.
129. Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol Rev* 87, 315-424.
130. Bredt, D. S. (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology, *Free Radic Res* 31, 577-596.
131. Mungrue, I. N., and Bredt, D. S. (2004) nNOS at a glance: implications for brain and brawn, *J Cell Sci* 117, 2627-2629.
132. Luo, C. X., and Zhu, D. Y. (2011) Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase, *Neurosci Bull* 27, 23-35.
133. Melikian, N., Seddon, M. D., Casadei, B., Chowienczyk, P. J., and Shah, A. M. (2009) Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation, *Trends Cardiovasc Med* 19, 256-262.
134. Reif, A., Frohlich, L. G., Kotsonis, P., Frey, A., Bommel, H. M., Wink, D. A., Pfeleiderer, W., and Schmidt, H. H. (1999) Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase, *J Biol Chem* 274, 24921-24929.

135. Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C., and Bredt, D. S. (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains, *Cell* 84, 757-767.
136. Brenman, J. E., Christopherson, K. S., Craven, S. E., McGee, A. W., and Bredt, D. S. (1996) Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein, *J Neurosci* 16, 7407-7415.
137. Jaffrey, S. R., Benfenati, F., Snowman, A. M., Czernik, A. J., and Snyder, S. H. (2002) Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3199-3204.
138. Haraguchi, K., Satoh, K., Yanai, H., Hamada, F., Kawabuchi, M., and Akiyama, T. (2000) The hDLG-associated protein DAP interacts with dynein light chain and neuronal nitric oxide synthase, *Genes Cells* 5, 905-911.
139. Rodriguez-Crespo, I., Straub, W., Gavilanes, F., and Ortiz de Montellano, P. R. (1998) Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition, *Arch Biochem Biophys* 359, 297-304.
140. Chaudhury, A., He, X. D., and Goyal, R. K. (2011) Myosin Va plays a key role in nitrergic neurotransmission by transporting nNOSalpha to enteric varicosity membrane, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301, G498-507.
141. Ong, C. C., Jubb, A. M., Zhou, W., Haverty, P. M., Harris, A. L., Belvin, M., Friedman, L. S., Koepfen, H., and Hoeflich, K. P. (2011) p21-activated kinase 1: PAK'ed with potential, *Oncotarget* 2, 491-496.
142. Holm, C., Rayala, S., Jirstrom, K., Stal, O., Kumar, R., and Landberg, G. (2006) Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients, *J Natl Cancer Inst* 98, 671-680.
143. Rayala, S. K., Talukder, A. H., Balasenthil, S., Tharakan, R., Barnes, C. J., Wang, R. A., Aldaz, C. M., Khan, S., and Kumar, R. (2006) P21-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor-alpha activation involves serine 305 activation linked with serine 118 phosphorylation, *Cancer Res* 66, 1694-1701.
144. Akinmade, D., Talukder, A. H., Zhang, Y., Luo, W. M., Kumar, R., and Hamburger, A. W. (2008) Phosphorylation of the ErbB3 binding protein Ebp1 by p21-activated kinase 1 in breast cancer cells, *Br J Cancer* 98, 1132-1140.
145. Vadlamudi, R. K., Adam, L., Wang, R. A., Mandal, M., Nguyen, D., Sahin, A., Chernoff, J., Hung, M. C., and Kumar, R. (2000) Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells, *J Biol Chem* 275, 36238-36244.
146. Wang, R. A., Zhang, H., Balasenthil, S., Medina, D., and Kumar, R. (2006) PAK1 hyperactivation is sufficient for mammary gland tumor formation, *Oncogene* 25, 2931-2936.
147. Lightcap, C. M., Kari, G., Arias-Romero, L. E., Chernoff, J., Rodeck, U., and Williams, J. C. (2009) Interaction with LC8 is required for Pak1 nuclear import and is indispensable for zebrafish development, *PLoS One* 4, e6025.
148. Kong, X., Gan, H., Hao, Y., Cheng, C., Jiang, J., Hong, Y., Yang, J., Zhu, H., Chi, Y., Yun, X., and Gu, J. (2009) CDK11p58 phosphorylation of PAK1 Ser174 promotes DLC2 binding and roles on cell cycle progression, *J Biochem* 146, 417-427.
149. Tegha-Dunghu, J., Neumann, B., Reber, S., Krause, R., Erfle, H., Walter, T., Held, M., Rogers, P., Hupfeld, K., Ruppert, T., Ellenberg, J., and Gruss, O. J. (2008) EML3 is a nuclear microtubule-binding protein required for the correct alignment of chromosomes in metaphase, *J Cell Sci* 121, 1718-1726.
150. Pollmann, M., Parwaresch, R., Adam-Klages, S., Kruse, M. L., Buck, F., and Heidebrecht, H. J. (2006) Human EML4, a novel member of the EMAP family, is essential for microtubule formation, *Exp Cell Res* 312, 3241-3251.
151. Eichenmuller, B., Everley, P., Palange, J., Lepley, D., and Suprenant, K. A. (2002) The human EMAP-like protein-70 (ELP70) is a microtubule destabilizer that localizes to the mitotic apparatus, *J Biol Chem* 277, 1301-1309.
152. Suprenant, K. A., Dean, K., McKee, J., and Hake, S. (1993) EMAP, an echinoderm microtubule-associated protein found in microtubule-ribosome complexes, *J Cell Sci* 104, 445-450.
153. Suprenant, K. A., Tuxhorn, J. A., Daggett, M. A., Ahrens, D. P., Hostetler, A., Palange, J. M., VanWinkle, C. E., and Livingston, B. T. (2000) Conservation of the WD-repeat, microtubule-binding protein, EMAP, in sea urchins, humans, and the nematode *C. elegans*, *Dev Genes Evol* 210, 2-10.

154. Houtman, S. H., Rutteman, M., De Zeeuw, C. I., and French, P. J. (2007) Echinoderm microtubule-associated protein like protein 4, a member of the echinoderm microtubule-associated protein family, stabilizes microtubules, *Neuroscience* 144, 1373-1382.
155. Rapali, P., Radnai, L., Suveges, D., Harmat, V., Tolgyesi, F., Wahlgren, W. Y., Katona, G., Nyitray, L., and Pal, G. (2011) Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel binders in the human proteome, *PLoS One* 6, e18818.
156. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., and Brenner, S. E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator, *Genome Res* 14, 1188-1190.
157. Sarkar, G., and Sommer, S. S. (1990) The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis, *Biotechniques* 8, 404-407.
158. van den Berg, S., Lofdahl, P. A., Hard, T., and Berglund, H. (2006) Improved solubility of TEV protease by directed evolution, *J Biotechnol* 121, 291-298.
159. Johnson, K. A., Simpson, Z. B., and Blom, T. (2009) Global kinetic explorer: a new computer program for dynamic simulation and fitting of kinetic data, *Anal Biochem* 387, 20-29.
160. Johnson, K. A., Simpson, Z. B., and Blom, T. (2009) FitSpace explorer: an algorithm to evaluate multidimensional parameter space in fitting kinetic data, *Anal Biochem* 387, 30-41.
161. Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants, *Journal of Applied Crystallography* 26, 795-800.
162. Collaborative. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallographica Section D* 50, 760-763.
163. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method, *Acta Crystallographica Section D* 53, 240-255.
164. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2005) Likelihood-enhanced fast translation functions, *Acta Crystallographica Section D* 61, 458-464.
165. Lamzin, V. S., and Wilson, K. S. (1993) Automated refinement of protein models, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49, 129-147.
166. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.
167. Vagin, A., and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 22-25.
168. Winn, M. D., Isupov, M. N., and Murshudov, G. N. (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 122-133.
169. Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996) Errors in protein structures, *Nature* 381, 272.
170. Laskowski, R. A., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures, *J Mol Biol* 231, 1049-1067.
171. O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., and Huang, D. C. (1998) Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis, *EMBO J* 17, 384-395.
172. Lo, K. W., Kan, H. M., and Pfister, K. K. (2006) Identification of a novel region of the cytoplasmic Dynein intermediate chain important for dimerization in the absence of the light chains, *J Biol Chem* 281, 9552-9559.
173. Klatt, P., Schmidt, K., Lehner, D., Glatter, O., Bachinger, H. P., and Mayer, B. (1995) Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer, *EMBO J* 14, 3687-3695.
174. Hevel, J. M., White, K. A., and Marletta, M. A. (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein, *J Biol Chem* 266, 22789-22791.
175. Kramer, R. H., and Karpen, J. W. (1998) Spanning binding sites on allosteric proteins with polymer-linked ligand dimers, *Nature* 395, 710-713.
176. Pabbisetty, K. B., Yue, X., Li, C., Himanen, J. P., Zhou, R., Nikolov, D. B., and Hu, L. (2007) Kinetic analysis of the binding of monomeric and dimeric ephrins to Eph receptors: correlation to function in a growth cone collapse assay, *Protein Sci* 16, 355-361.
177. Zhou, H. X. (2003) Quantitative account of the enhanced affinity of two linked scFvs specific for different epitopes on the same antigen, *J Mol Biol* 329, 1-8.
178. Zhou, H. X. (2006) Quantitative relation between intermolecular and intramolecular binding of pro-rich peptides to SH3 domains, *Biophys J* 91, 3170-3181.
179. Navarro-Lerida, I., Martinez Moreno, M., Roncal, F., Gavilanes, F., Albar, J. P., and Rodriguez-Crespo, I. (2004) Proteomic identification of brain proteins that interact with dynein light chain LC8, *Proteomics* 4, 339-346.

180. Lajoix, A. D., Gross, R., Aknin, C., Dietz, S., Granier, C., and Laune, D. (2004) Cellulose membrane supported peptide arrays for deciphering protein-protein interaction sites: the case of PIN, a protein with multiple natural partners, *Mol Divers* 8, 281-290.
181. Lo, K. W., Kan, H. M., Chan, L. N., Xu, W. G., Wang, K. P., Wu, Z., Sheng, M., and Zhang, M. (2005) The 8-kDa dynein light chain binds to p53-binding protein 1 and mediates DNA damage-induced p53 nuclear accumulation, *J Biol Chem* 280, 8172-8179.
182. Schwanhauser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control, *Nature* 473, 337-342.
183. Rudnick, S. I., and Adams, G. P. (2009) Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting, *Cancer Biother Radiopharm* 24, 155-161.
184. Mammen, M., Choi, S. K., and Whitesides, G. M. (1998) Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors, *Angew Chem Int Edit* 37, 2755-2794.
185. Benison, G., Chiodo, M., Karplus, P. A., and Barbar, E. (2009) Structural, thermodynamic, and kinetic effects of a phosphomimetic mutation in dynein light chain LC8, *Biochemistry* 48, 11381-11389.
186. Yang, P., Yang, C., Wirschell, M., and Davis, S. (2009) Novel LC8 mutations have disparate effects on the assembly and stability of flagellar complexes, *J Biol Chem* 284, 31412-31421.
187. Fan, J. S., Zhang, Q., Tochio, H., and Zhang, M. (2002) Backbone dynamics of the 8 kDa dynein light chain dimer reveals molecular basis of the protein's functional diversity, *J Biomol NMR* 23, 103-114.
188. Benison, G., and Barbar, E. (2009) NMR analysis of dynein light chain dimerization and interactions with diverse ligands, *Methods Enzymol* 455, 237-258.
189. Cserehely, P., Palotai, R., and Nussinov, R. (2010) Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: an extended view of binding events, *Trends Biochem Sci* 35, 539-546.
190. Vertessy, B. G., and Orosz, F. (2011) From "fluctuation fit" to "conformational selection": evolution, rediscovery, and integration of a concept, *Bioessays* 33, 30-34.
191. Wlodarski, T., and Zagrovic, B. (2009) Conformational selection and induced fit mechanism underlie specificity in noncovalent interactions with ubiquitin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19346-19351.
192. Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast, *Nature* 425, 737-741.
193. Varma, D., Dawn, A., Ghosh-Roy, A., Weil, S. J., Ori-McKenney, K. M., Zhao, Y., Keen, J., Vallee, R. B., and Williams, J. C. (2010) Development and application of in vivo molecular traps reveals that dynein light chain occupancy differentially affects dynein-mediated processes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3493-3498.
194. Hinds, M. G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J. M., Bailey, M., Huang, D. C., and Day, C. L. (2007) Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets, *Cell Death Differ* 14, 128-136.
195. Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2002) Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2754-2759.
196. Dou, Y., Baisnee, P. F., Pollastri, G., Pecout, Y., Nowick, J., and Baldi, P. (2004) ICBS: a database of interactions between protein chains mediated by beta-sheet formation, *Bioinformatics* 20, 2767-2777.
197. Khakshoor, O., Lin, A. J., Korman, T. P., Sawaya, M. R., Tsai, S. C., Eisenberg, D., and Nowick, J. S. (2010) X-ray crystallographic structure of an artificial beta-sheet dimer, *J Am Chem Soc* 132, 11622-11628.
198. Levin, S., and Nowick, J. S. (2009) A new artificial beta-sheet that dimerizes through parallel beta-sheet interactions, *Org Lett* 11, 1003-1006.
199. Nowick, J. S. (2008) Exploring beta-sheet structure and interactions with chemical model systems, *Acc Chem Res* 41, 1319-1330.
200. Benson, M. D. (2003) The hereditary amyloidoses, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 17, 909-927.
201. Koo, E. H., Lansbury, P. T., Jr., and Kelly, J. W. (1999) Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9989-9990.
202. Merlini, G., and Westermark, P. (2004) The systemic amyloidoses: clearer understanding of the molecular mechanisms offers hope for more effective therapies, *J Intern Med* 255, 159-178.
203. Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M. J., and Westermark, P. (2010) Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis, *Amyloid* 17, 101-104.

204. Bellotti, V., Nuvolone, M., Giorgetti, S., Obici, L., Palladini, G., Russo, P., Lavatelli, F., Perfetti, V., and Merlini, G. (2007) The workings of the amyloid diseases, *Ann Med* 39, 200-207.
205. Karran, E., Mercken, M., and De Strooper, B. (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics, *Nat Rev Drug Discov* 10, 698-712.
206. Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F., and Tycko, R. (2002) A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16742-16747.
207. Williams, J. C., Xie, H., and Hendrickson, W. A. (2005) Crystal structure of dynein light chain TeTex-1, *J Biol Chem* 280, 21981-21986.
208. Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P. J., Kikuchi, A., Higuchi, Y., and Bienz, M. (2007) The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization, *Nat Struct Mol Biol* 14, 484-492.
209. Illes, A., Enyedi, B., Tamas, P., Balazs, A., Bogel, G., and Buday, L. (2006) Inducible phosphorylation of cortactin is not necessary for cortactin-mediated actin polymerisation, *Cell Signal* 18, 830-840.

12. Függelék

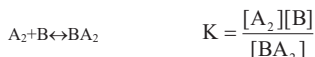
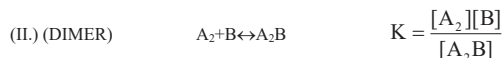
12.1. Bizonyítás: két kötőhelyes rendszer leírása egy kötőhelyet feltételező modell segítségével

A két modell:

(I.): Monomer fehérje (A) interakciója monomer ligandummal (B).

(II.): Dimer fehérje (A₂) interakciója monomer ligandummal (B).

Bizonyítjuk, hogy az (I.) modell alkalmazható a (II.) modell helyett egyensúlyi titrálásos kísérletek adatainak elemzésére, akkor, ha a dimer fehérje két kötőhelye azonos és egymástól független! Feltételezzük, hogy a két esetben a (kötőhely és a ligandum között értelmezett) mikroszkopikus disszociációs konstans (K, definíciót lásd lent!) az (I.) és (II.) esetben számértékét tekintve megegyezik. Következtetés: Ha az (I.) modellt egy dimer fehérje (pl. DYNLL) esetén egyensúlyi titrálásos kísérlet adatainak elemzésére használjuk, a kapott disszociációs állandó maga a mikroszkopikus disszociációs konstans.



$$[A_2B] = [BA_2] = \frac{[A_2][B]}{K} \quad \text{és} \quad [A_2B_2] = \frac{[A_2][B]^2}{K^2}$$

Definiáljuk a ligandum által elfoglalt kötőhelyek arányát, más néven a szaturációt (x = ligandum által elfoglalt kötőhelyek száma / összes kötőhely):

(I.) (MON)

$$x = \frac{[AB]}{[A] + [AB]} = \frac{\frac{[A][B]}{K}}{[A] + \frac{[A][B]}{K}} = \frac{[B]}{K + [B]}$$

(II.) (DIM)

$$x = \frac{[A_2B] + [BA_2] + 2[A_2B_2]}{2[A_2] + 2[A_2B] + 2[BA_2] + 2[A_2B_2]} = \frac{2\frac{[A_2][B]}{K} + 2\frac{[A_2][B]^2}{K^2}}{2[A_2] + 2\left(2\frac{[A_2][B]}{K}\right) + 2\frac{[A_2][B]^2}{K^2}} = \frac{[B]}{K + [B]}$$

Hasonlóan definiálhatjuk a szabad helyek arányát (y)! (x + y = 1)

(I.) (MON)

$$y = \frac{[A]}{[A] + [AB]} = \frac{K}{K + [B]}$$

(II.) (DIM)

$$x = \frac{2[A_2] + [A_2B] + [BA_2]}{2[A_2] + 2[A_2B] + 2[BA_2] + 2[A_2B_2]} = \frac{K}{K + [B]}$$

Modell	Összes kötőhely	Foglalt kötőhely:	Szabad kötőhely
(I.) (MON)	$[A]_0$	$x[A]_0$	$y[A]_0$
(II.) (DIM)	$2[A_2]_0$	$2x[A_2]_0$	$2y[A_2]_0$

($[A]_0$ és $[A_2]_0$ az A ill. A_2 fehérje összkoncentrációját jelenti a két modellben.)

- A FOGLALT KÖTŐHELYEK SZÁMA MEGEGYEZIK A KÖTÖTT LIGANDUMOK SZÁMÁVAL!
- ÖSSZES LIGANDUM ($[B]_0$) = KÖTÖTT LIGANDUM + SZABAD LIGANDUM ($[B]$)!

(I.) (MON) $[B]_0 = [A]_0 x + [B] = [A]_0 \frac{[B]}{K + [B]} + [B]$

Átrendezve: $[B]^2 + (K + [A]_0 - [B]_0)[B] - K[B]_0 = 0$

(II.) (DIM) $[B]_0 = 2[A_2]_0 x + [B] = 2[A_2]_0 \frac{[B]}{K + [B]} + [B]$

Átrendezve: $[B]^2 + (K + 2[A_2]_0 - [B]_0)[B] - K[B]_0 = 0$

(I.) (MON)

$$[B]_{1,2} = \frac{-K - [A]_0 + [B]_0 \pm \sqrt{(K + [A]_0 - [B]_0)^2 + 4K[B]_0}}{2}$$

Mivel mindig igaz, hogy: $K > 0$; $[A]_0 \geq 0$; $[B]_0 \geq 0$, így:

$$K + [A]_0 - [B]_0 \leq \sqrt{(K + [A]_0 - [B]_0)^2 + 4K[B]_0}, \text{ vagyis:}$$

$$-K - [A]_0 + [B]_0 \geq -\sqrt{(K + [A]_0 - [B]_0)^2 + 4K[B]_0}$$

Továbbá mindig igaz, hogy:

$$[B] \geq 0$$

Ha:

$$0 > -K - [A]_0 + [B]_0,$$

akkor:

$$[B] = \frac{-K - [A]_0 + [B]_0 - \sqrt{(K + [A]_0 - [B]_0)^2 + 4K[B]_0}}{2} \text{ negatív lenne! Tudjuk, hogy } [B] \text{ mindig}$$

pozitív (vagy 0), hiszen ez egy koncentráció.

KÖVETKEZTETÉS: A másodfokú egyenlet kémiaiilag értelmes gyöke:

$$[B] = \frac{-K - [A]_0 + [B]_0 + \sqrt{(K + [A]_0 - [B]_0)^2 + 4K[B]_0}}{2}$$

(II.) (DIM) (A levezetés és indoklás az előző esethez hasonlóan.)

$$[B] = \frac{-K - 2[A_2]_0 + [B]_0 + \sqrt{(K + 2[A_2]_0 - [B]_0)^2 + 4K[B]_0}}{2}$$

Mivel mindkét modell szerint a ligandum által elfoglalt kötőhelyek aránya (szaturáció):

$$x = \frac{[B]}{K + [B]}$$

továbbá a fenti egyenletek $[B]$ -re vonatkozóan alakilag azonosak, így egyértelmű, hogy használhatjuk az (I.) modellt egy dimer fehérje (pl. DYNLL) esetén egyensúlyi titrálási kísérlet adatainak elemzésére, ha a mért jel a szaturációval arányos. (Ez esetben a dimer fehérje koncentrációját monomer formára vonatkoztatva kell megadni.) A kapott disszociációs állandó maga a mikroszkopikus disszociációs konstans.

Előfordulhat, hogy a mért jel valamelyik komponens egyensúlyi koncentrációjával arányos, ezért ezek számításának módját a két modell szerint az alábbiakban adom meg:

Modell (I.): szabad fehérje: [A], és komplex: [AB]

(I.) (MON) A szabad kötőhelyek aránya:

$$y = \frac{K}{K + [B]} \quad \text{Tehát:} \quad [A] = \frac{K[A]_0}{K + [B]}$$

(I.) (MON) A foglalt kötőhelyek aránya (szaturáció):

$$x = \frac{[B]}{K + [B]} \quad \text{Tehát:} \quad [AB] = \frac{[B][A]_0}{K + [B]}$$

Modell (II.): szabad fehérje: $[A_2]$, és komplexek: $[A_2B]$, $[B A_2]$, $[A_2B_2]$ (Az előzőhöz hasonló logika szerint számításba véve a „párosával” szabad helyeket, az „önállóan” szabad helyeket, valamint a „párosával” foglalt helyeket; részletesen csak az első példán bemutatva.)

(II.) (DIM) A „párosával” szabad kötőhelyek aránya:

$$\frac{2[A_2]}{2[A_2] + 2[A_2B] + 2[BA_2] + 2[A_2B_2]} = \frac{K^2}{K^2 + 2K[B] + [B]^2}$$

$$\text{Tehát:} \quad [A_2] = \frac{K^2[A_2]_0}{K^2 + 2K[B] + [B]^2}$$

$$\text{Hasonlóan: } [A_2B] = \frac{K[B][A_2]_0}{K^2 + 2K[B] + [B]^2} \quad \text{és} \quad [BA_2] = \frac{K[B][A_2]_0}{K^2 + 2K[B] + [B]^2}$$

Ezeket makroszkopikus értelemben nem tudjuk megkülönböztetni, tehát:

$$[A_2B]_{\text{macroscopé}} = [A_2B]_{\text{microscopé}} + [BA_2]_{\text{microscopé}}$$

$$\text{Tehát:} \quad [A_2B]_{\text{macroscopé}} = \frac{2K[B][A_2]_0}{K^2 + 2K[B] + [B]^2}$$

$$\text{Valamint:} \quad [A_2B_2] = \frac{[B]^2[A_2]_0}{K^2 + 2K[B] + [B]^2}$$

12.2. Röntgen-krisztallográfiai mérések, illetve a modellépítés és finomítás statisztikai adatai

	DYNLL2 / Ac-SRGTQTE	DYNLL2 / Leu-zipper dimerized GSVSRGTQTE	DYNLL2 / MyoVa
<i>Data collection</i>			
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P6122
Cell parameters			
<i>a</i> (Å)	35.6	53.8	45.16
<i>b</i> (Å)	64.0	68.4	45.16
<i>c</i> (Å)	151.8	101.7	204.01
α,β,γ (°)	90	90	90, 90, 120
Resolution (Å)	151.84-1.31 (1.34-1.31) ^a	42.31-2.90 (3.00-2.90)	204.01-1.85 (1.90-1.85)
Total reflections	624141	26916	
Unique reflections	81872	8273	
Completeness (%)	96.0 (67.1)	94.4 (96.6)	99.72 ()
<i>R</i> _{sym} (%) ^b	8.0 (39.3)	13.1 (57.6)	
< <i>I</i> / σ>	15.7 (2.9)	6.4 (1.5)	
<i>Refinement</i>			
Resolution (Å)	151.84-1.31 (1.34-1.31)	42.31-2.90 (2.98-2.90)	204.01-1.85 (1.90-1.85)
No. reflections	77776 (3930)	8271 (619)	10928 (790)
No. of amino acids			
DYNLL2	347	174	92
Peptide	24	85	12
No. of modeled non-hydrogen atom positions	3625	2040	1000
Average <i>B</i> -factor (all atoms, Å ²)	10.5	64.8	13.8
<i>R</i> _{cryst} (%)	12.1 (18.4)	25.0 (32.8)	19.1 (24.6)
<i>R</i> _{free} (%) ^c	15.6 (21.4)	29.5 (40.4)	22.9 (32.4)
R.m.s. deviation from ideal bond length (Å)	0.024	0.011	0.009
R.m.s. deviation from ideal bond angles (°)	1.99	1.12	1.109
Ramachandran plot (% by PROCHECK)			
Most favored	90.6	92.8	89.5
Additionally allowed	8.3	6.4	9.5
Generously allowed	0.0	0.0	0
Disallowed	1.2	0.9	1.1
PDB reference code	2XQQ	3P8M	4AEG

^aValues in parentheses indicate statistics for the highest resolution shell.

^b $R_{sym} = \sum_h \sum_i |I_{hi} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_i \langle I_h \rangle$

^c5.0% of the reflections in a test set for monitoring the refinement process.

12.3. Bizonyítás: az indukált illeszkedés (IF), a konformációs szelekció (CS), valamint az egyszerű kötődési egyensúly modellek összehasonlítása.

A következőkben bizonyítjuk, hogy az egyszerű egyensúly modell használható a címben említett két bonyolultabb mechanizmus (IF, CS) szerint történő ligandumkötési reakciók analizisére (egyensúlyi titrálások kísérletek esetén). (Ennek a levezetésnek a fontosságát az adja, hogy gyakran alkalmazzuk az egyszerű kötődési modellt a DYNLL partner kötési reakcióinak leírására, pl. az összes ITC mérés esetén, holott tranziens kinetikai méréseink és irodalmi adatok szerint sokkal inkább a CS modell lenne megfelelő.) Fontos megjegyezni, hogy mindhárom modell esetén az asszociációra vonatkozó egyensúlyi állandókat definiáljuk, szemben a korábbi levezetésekben használt disszociációs állandókkal.

Egyszerű egyensúly – „A” fehérje titrálása „B” ligandummal



A teljes fehérjekoncentráció ($[A]_0$):

$$[A]_0 = [A] + [AB]$$

$$[A]_0 = [A] + K[A][B]$$

A teljes ligandum-koncentráció ($[B]_0$):

$$[B]_0 = [B] + [AB]$$

$$[B]_0 = [B] + K[A][B]$$

A fenti egyenletekből kifejezve $[A]$ -t:

$$[A] = \frac{[A]_0}{1 + K[B]}$$

Behelyettesítve a $[B]_0$ -ra kapott összefüggésbe:

$$[B]_0 = [B] + \frac{K[B][A]_0}{1 + K[B]}$$

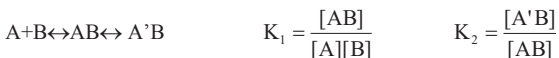
Átrendezve:

$$K[B]^2 + (1 + K([A]_0 - [B]_0))[B] - [B]_0 = 0$$

Az egyenlet kémiailag értelmes megoldása:

$[B] = \frac{-(1 + K([A]_0 - [B]_0)) + \sqrt{(1 + K([A]_0 - [B]_0))^2 + 4K[B]_0}}{2K}$
--

Indukált Illeszkedés (IF)– „A” fehérje titrálása „B” ligandummal, majd a keletkező komplex konformációs változása



A teljes fehérjekoncentráció ($[A]_0$):

$$[A]_0 = [A] + [AB] + [A'B]$$

$$[A]_0 = [A] + K_1[A][B] + K_1K_2[A][B]$$

$$[A]_0 = [A] + K_1(1 + K_2)[A][B]$$

$$[A]_0 = [A] + K_{eq}[A][B]$$

A teljes ligandum-koncentráció ($[B]_0$):

$$[B]_0 = [B] + [AB] + [A'B]$$

$$[B]_0 = [B] + K_1[A][B] + K_1K_2[A][B]$$

$$[B]_0 = [B] + K_1(1 + K_2)[A][B]$$

$$[B]_0 = [B] + K_{eq}[A][B]$$

$$K_{eq} = K_1(1 + K_2)$$

K_{eq} : a teljes kapcsolt egyensúlyra vonatkozó, látszólagos egyensúlyi állandó

A fenti egyenletekből kifejezve $[A]$ -t:

$$[A] = \frac{[A]_0}{1 + K_{eq}[B]}$$

Behelyettesítve a $[B]_0$ -ra kapott összefüggésbe:

$$[B]_0 = [B] + \frac{K_{eq}[B][A]_0}{1 + K_{eq}[B]}$$

Átrendezve:

$$K_{eq}[B]^2 + (1 + K_{eq}([A]_0 - [B]_0))[B] - [B]_0 = 0$$

Az egyenlet kémiaiailag értelmes megoldása:

$$[B] = \frac{-\left(1 + K_{eq}([A]_0 - [B]_0)\right) + \sqrt{\left(1 + K_{eq}([A]_0 - [B]_0)\right)^2 + 4K_{eq}[B]_0}}{2K_{eq}}$$

Konformációs Szelekció (CS)– „A” fehérje titrálása „B” ligandummal: „A” izomerizációs egyensúlya (konformáció-változás), majd a ligandum kötésére alkalmas forma (A') kölcsönhatása „B” ligandummal



A teljes fehérjekoncentráció ($[A]_0$):

$$[A]_0 = [A] + [A'] + [A'B]$$

$$[A]_0 = [A] + K_1[A] + K_1K_2[A][B]$$

A teljes ligandum-koncentráció ($[B]_0$):

$$[B]_0 = [B] + [A'B]$$

$$[B]_0 = [B] + K_1K_2[A][B]$$

A fenti egyenletekből kifejezve $[A]$ -t:

$$[A] = \frac{[A]_0}{1 + K_1 + K_1K_2[B]}$$

Behelyettesítve a $[B]_0$ -ra kapott összefüggésbe:

$$[B]_0 = [B] + \frac{K_1K_2[B][A]_0}{1 + K_1 + K_1K_2[B]}$$

Átrendezve:

$$\frac{K_1K_2}{1 + K_1} [B]^2 + \left(1 + \frac{K_1K_2}{1 + K_1} ([A]_0 - [B]_0)\right) [B] - [B]_0 = 0$$

$$K_{eq} = \frac{K_1K_2}{1 + K_1}$$

K_{eq} : a teljes kapcsolt egyensúlyra vonatkozó, látszólagos egyensúlyi állandó

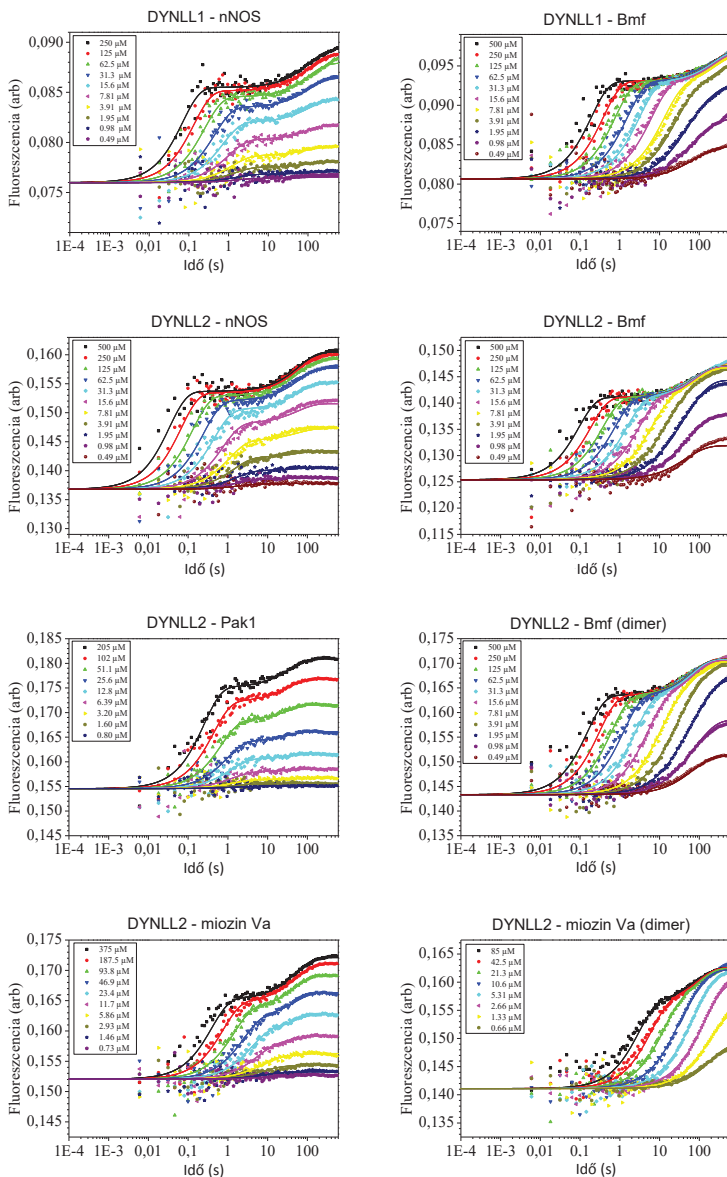
$$K_{eq} [B]^2 + (1 + K_{eq} ([A]_0 - [B]_0)) [B] - [B]_0 = 0$$

Az egyenlet kémiailag értelmes megoldása:

$$[B] = \frac{-(1 + K_{eq} ([A]_0 - [B]_0)) + \sqrt{(1 + K_{eq} ([A]_0 - [B]_0))^2 + 4K_{eq} [B]_0}}{2K_{eq}}$$

KÖVETKEZTETÉS: A $[B]$ -re kapott összefüggések hasonlósága egyértelműen bizonyítja, hogy az egyszerű kötődési modell alkalmas egy IF vagy CS mechanizmussal működő rendszer leírására. Ez esetben a meghatározott egyensúlyi állandók látszólagosak, a teljes kapcsolt folyamatra vonatkoznak (K_{eq}), az első és a második reakciólépés egyensúlyi állandóitól (K_1 , K_2) is függenek a fenti definíciók szerint.

12.4. A DYNLL-partner interakciók kinetikai analizise



Tranziens kinetikai mérések: A megállított áramlásos fluoreszcens spektroszkópiai (*stopped-flow*) kísérletekben a DYNLL 54. triptofánjának fluoreszcencia-változását követtük nyomon, miután a DYNLL oldatot a megfelelő partner oldatával egyszerre a készülékben található küvettába injektáltuk, így összekeverve az oldatokat. A triptofánt szelektíven gerjesztettük 297 nm-en, míg az emittált fényt 340 nm-en detektáltuk. Az fluoreszcenciát viszonyítási értékeként (arbitrary units, arb) ábrázoltuk. A DYNLL koncentrációja a kísérletekben 1.5 μM volt, míg az egyes partnerekből koncentráció sorokat készítettünk. Az egyes koncentráció értékeket az ábrákon tüntettem fel. Ezek (illetve a DYNLL-re vonatkozó 1.5 μM is) a keverés után vett, monomerre vonatkoztatott értékeket jelentik. Jól látható, hogy minden esetben kétfázisú átmenetet tapasztaltunk. A Kintek Explorer Pro szoftver segítségével végeztük el a konformációs szelekció (CS) modell globális illesztését, amit az ábrákon a folytonos görbék mutatnak be.

12.5. A Konformációs Szelekció (CS) és az Indukált Illeszkedés (IF) modellek segítségével meghatározott kinetikai állandók

Performance Statistics (CS)																						
Partner	Isomorph	K_1	K_2	K_3	K_4	K_5	K_6	K_7	K_8	K_9	K_{10}	K_{11}	K_{12}	K_{13}	K_{14}	K_{15}	K_{16}	K_{17}	K_{18}	K_{19}	K_{20}	K_{21}
Inf	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
Inf	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
dimer Inf	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.338	2.154	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Lejorh Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
	Also Isom	1.468	6.262	2.006	1.984	1.042	2.062	2.083	1.268	1.342	4.522	6.622	5.114	6.472	4.862	3.8E-3	18.1	281	5.9E-2	1.4E-3	297	1090
nMS	Fello Isom	1.686	9.820	2.3																		

A CS modell k_{on}^C és k_{off}^C paraméterei a kötődési lépés asszociációs és disszociációs sebességi állandói, míg a k_{+1}^C és k_{-1}^C paraméterek az izomerizációs lépés (előre és visszafele irányuló reakciókra vonatkozó) sebességi állandói. Az f1, f2, f3 paraméterek a partnerkötésre képtelen DYNLL forma, a partnerkötésre képes DYNLL forma és a DYNLL-partner komplex fluoreszcencia intenzitásai.

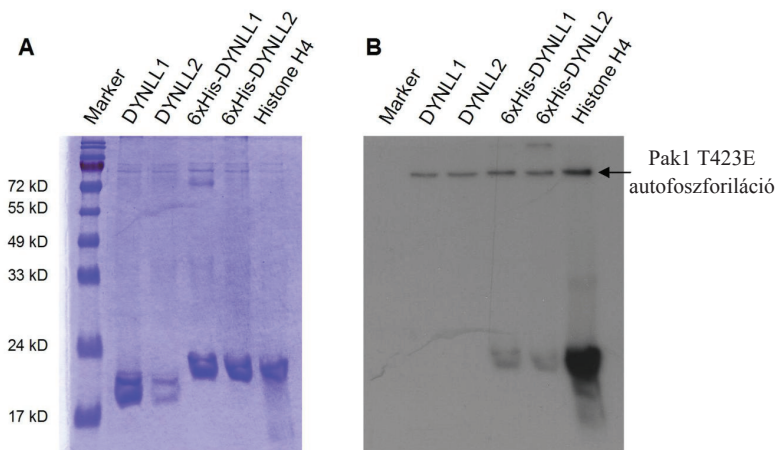
Az IF modell k_{on}^I és k_{off}^I paraméterei a kötődési lépés asszociációs és disszociációs sebességi állandói, míg a k_{+1}^I és k_{-1}^I paraméterek az izomerizációs lépés (előre és visszafele irányuló reakciókra vonatkozó) sebességi állandói. Az f1, f2, f3 paraméterek a szabad DYNLL, az „átmeneti” DYNLL-partner komplex és az izomerizáción átesett DYNLL-partner komplex fluoreszcencia intenzitásai.

A megadott „StdErr” (Standard Error) értékek a modellillesztés hibái, míg a felső és alsó korlátokat az egyes paraméterekre (a paraméter értéke („legjobb ill.”) felett és alatt) a FitSpace Explorer algoritmussal (160) határoztuk meg (függelék, 12.7.).

A modellek globális illesztése során a legtöbb paramétert sikerült kellő pontossággal meghatározni, kivéve a k_{+1}^I és f3 paramétereket az IF, valamint a k_{-1}^C és f1 paramétereket a CS modell esetén. Ennek oka, hogy a mért adatok nem azonos mennyiségű információval szolgálnak a különböző reakciólépésekre, illetve paraméterekre vonatkozóan.

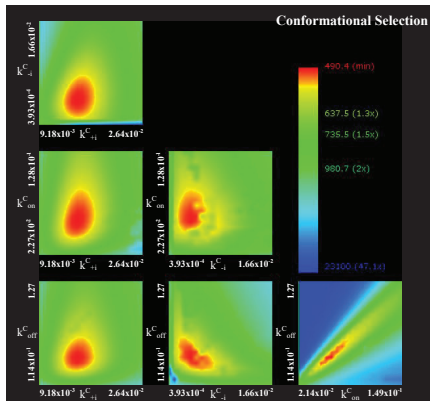
A kinetikai konstansok értékeit felhasználva kiszámítottuk a kötődési lépésre vonatkozó asszociációs (K_B^C) és disszociációs egyensúlyi állandókat ($K_B^{C_{eq}}$), illetve az izomerizációs lépésre vonatkozó előre (K^C) és visszamatató (K_d^C) egyensúlyi állandókat a CS, illetve az IF modell esetén (K_B^I , $K_B^{I_{eq}}$, K^I , K_d^I) is. Ezeket az értékeket felhasználva a függelék 12.3. fejezetben megadottak szerint kiszámítottuk a teljes kapcsolt egyensúlyra (mindkét reakciólépésre) vonatkozó, asszociációs (K_{eq}^C) és disszociációs egyensúlyi állandókat ($K_{d,eq}^C$). (Az IF modell esetén: K_{eq}^I , $K_{d,eq}^I$.) Összehasonlításképpen az ITC-vel közvetlenül meghatározott $K_{d,eq}$ értékeket a táblázat utolsó sorában láthatjuk.

12.6. A DYNLL izoformák *in vitro* foszforilációja Pak1 kináz által

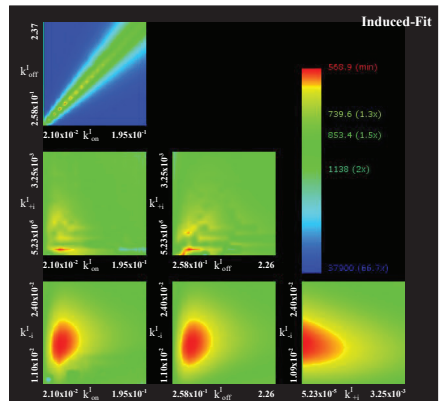


DYNLL fehérjék konstitutívan aktív Pak1-gyel történő foszforilációja: A Pak1 kináz konstitutívan aktív mutánsát (T423E mutáns (209)) tartalmazó konstrukcióval 10^6 db COS7 sejtet transzfektáltunk. 48 órával később a sejteket lizáltuk, majd a Pak1 fehérjét protein-A sepharose-oszlopon immobilizált anti-PAK1 poliklonális antitest (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) segítségével immunprecipitáltuk. Az oszloptöltetet háromszor mostuk a lízis pufferrel, valamint háromszor a „kináz pufferrel” (25 mM HEPES pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$ and 0.5 mM EGTA) 4 °C-on. Az összes reakció 30 μ l végtérfogatban, kináz pufferben zajlott, mely 5 μ g rekombináns DYNLL fehérjét, illetve ugyanennyi H4 hisztont (pozitív kontroll) tartalmazott. A reakciót 100 μ M ATP (beleértve az izotóp-jelölt ATP-t (2 μ Ci [γ - 32 P]ATP) is) hozzáadásával indítottuk. Harminc perces, 25 °C-on történő inkubáció után a reakció leállítása 10 μ l 4x-es SDS mintapuffer hozzáadásával történt. A mintákat 15%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, majd a gél kiszárítása után a foszforilációt autoradiográfiával (2–12 h) mutattuk ki. Coomassie festés (A) és autoradiográfia (B). Látható, hogy a Pak1 kináz csak a hexahisztidin-címkével (6xHis-tag) ellátott DYNLL izoformákat foszforilálta. (A kísérleteket Hódi Zsuzsa és Dr. Buday László végezte.)

12.7. A FitSpace Explorer algoritmus működése a DYNLL2-nNOS interakció példáján szemléltetve.



Konformációs Szelekció (CS)



Indukált-Illeszkedés (IF)

A FitSpace Explorer (160) felső és alsó korlátokat számít a modell minden paraméterére, úgy, hogy a paramétereket páronként fixálja különböző, az optimálistól eltérő értékeken, majd a fennmaradó paramétereket szabadon változtatva illeszt, végül meghatározza az adott illesztés χ^2 értékét. Ez annál nagyobb, minél messzebb fixáltak a paraméter párt az optimális értékektől. Az ábrák színskálája az illesztés jóságát szimbolizálja (piros: nagyon jó – kék: nagyon rossz). A felső és alsó korlátok (sárga) a paraméterek azon értékeit jelentik, ahol a χ^2 értéke a (legjobb illeszkedésre számított) minimális érték 1,1-szerese. Látható, hogy a CS modell esetén a paraméterek jobban definiáltak.